

**Wirkung des HSP90-Inhibitors AUY922 in
Ewing-Sarkomzellen**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

doctor medicinae (Dr. med.)

**vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität Jena**

**von Marc U. Schaarschmidt
geboren am 02. November 1993 in Marienberg**

Gutachter

- 1. Prof. Dr. med. James F. Beck, Jena**
- 2. apl. Prof. Dr. med. Sebastian Scholl, Jena**
- 3. Prof. Dr. med. Ingo Müller, Hamburg**

Tag der öffentlichen Verteidigung: 03.02.2020

Abkürzungsverzeichnis

$\Delta\Psi_m$	mitochondriales Membranpotential
Abb.	Abbildung
ADP	Adenosindiphosphat
Aha1	<i>activator of Hsp90 ATPase homolog 1</i>
AIF	<i>apoptosis inducing factor</i>
AML	akute myeloische Leukämie
APAF1	<i>Apoptotic Protease-Activating Factor-1</i>
ATM	<i>Ataxia-telangiectasia mutated kinase</i>
ATP	Adenosintriphosphat
ATR	<i>Ataxia telangiectasia and Rad3 related</i>
ATRIP	<i>ATR-interacting protein</i>
BAD	<i>BCL-2 agonist of cell death</i>
BAK	<i>BCL-2 homologous antagonist/killer</i>
BAX	BCL-2-aktiviertes X Protein
BCA	Bicinchoninsäure
BCL-2	<i>B-cell lymphoma 2</i> (Proto-Onkogen, antiapoptotisches Protein)
BCL-xL	<i>B-cell lymphoma-extra large</i>
BIM	<i>BCL-2-like protein 11</i>
BRCA1	<i>breast cancer 1, early-onset</i> (Brustkrebsgen 1)
BSA	bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CaMKII	<i>Calcium/calmodulin-dependent protein kinase type II</i>
Cdc37	<i>cell division cycle 37</i>
CDK	<i>Cyclin-dependent kinase</i>
cDNA	<i>complementary deoxyribonucleic acid</i> (komplementäre Desoxyribonukleinsäure)
CHIP	<i>c-terminus of HSP70-interacting protein</i>
CHK	Checkpoint-Kinase
CI	Kombinationsindex
CML	chronische myeloische Leukämie
CT	<i>cycle threshold</i> (Schwellenwert)

DiOC ₆ (3)	3'3-Dihexyloxacarbocyaniniodid
DISC	<i>Death inducing signaling complex</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i> (Desoxyribonukleinsäure)
DNA-PK	<i>DNA-dependent protein kinase</i>
dNTP	<i>deoxynucleoside triphosphates</i> (Desoxyribonukleosidtriphosphate)
DPBS	<i>Dulbecco's phosphate-buffered saline</i> (phosphatgepufferte Salzlösung)
DSB	Doppelstrangbruch
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i>
ERbB2/HER2	<i>human epidermal growth factor receptor 2</i>
ERG	<i>ETS-related gene</i>
ERK	<i>extracellular signal-regulated kinase</i>
ETS	<i>erythroblast transformation-specific</i>
EWS/EWSR1	<i>Ewing sarcoma breakpoint region 1</i>
EZM	extrazelluläre Matrix
FACS	<i>fluorescence activated cell sorter</i> (Fluoreszenz-aktivierter Zellsortierer)
FKS	fetales Kälberserum
FLI1	<i>Friend leukemia integration 1 transcription factor</i>
FSC	<i>forward scatter</i> (Vorwärtsstreulicht)
GI ₅₀	<i>half maximal growth-inhibition concentration</i> (mittlere wachstumshemmende Konzentration)
Gy	Gray
h	<i>hour</i> (Stunde)
HIF1A	<i>Hypoxia inducible factor 1 alpha</i>
Hop	<i>HSP70-HSP90 organizing protein</i>
HSF1	Hitze-Schock-Faktor 1
HSC	<i>heat stress cognate</i>
HSP	Hitze-Schock-Protein
H2AX	<i>H2A histone family member X</i>
IC ₅₀	<i>half maximal inhibitory concentration</i> (mittlere inhibitorische Konzentration)

IGF-1	<i>Insulin-like-growth factor 1</i>
IGF-1R	<i>Insulin-like growth factor 1 receptor</i>
IGFBP-3	<i>Insulin-like growth factor-binding protein 3</i>
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm
µg	Mikrogramm
MAPK	<i>mitogen activated protein kinase</i>
MCL-1	<i>Induced Myeloid Leukemia Cell Differentiation Protein</i>
MDM-2	<i>Mouse double minute 2 homolog</i>
mg	Milligramm
min	Minute
µl	Mikroliter
ml	Milliliter
µM	Mikromolar
mM	Millimolar
MMP-2	Matrixmetalloproteinase-2
mRNA	<i>messenger ribonucleic acid</i>
mTOR	<i>mechanistic Target of Rapamycin</i>
NKX2.2	<i>Homeobox protein Nkx-2.2</i>
nM	Nanomolar
nm	Nanometer
NOXA	<i>Phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1</i>
NR0B1	<i>Nuclear receptor subfamily 0 group B member 1</i>
NTC	<i>not template control</i> (negativ-Kontrollen ohne cDNA)
nTERT	humane Telomerase-Reverse-Transkriptase
PARP	Poly(ADP-Ribose)Polymerase
PIKK	<i>Phosphatidylinositol 3-kinase-related kinases</i>
PP5	<i>protein phosphatase 5</i>
PUMA	<i>p53 upregulated modulator of apoptosis</i>
p21	CDK-Inhibitor 1
p53	Protein 53
Rb1	<i>Retinoblastoma-associated protein</i>
PI	Propidiumiodid
RIPA	<i>radioimmunoprecipitation assay buffer</i>

RNA	<i>ribonucleic acid</i> (Ribonukleinsäure)
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i> (Reaktive Sauerstoffspezies)
RPMI-1640	Zellkulturmedium, formuliert am <i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RT-PCR	<i>real-time-polymerase chain reaction</i> (Echtzeit-Polymerasekettenreaktion)
s.	siehe
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i> (Natriumdodecylsulfat)
SEM	<i>standard error of the mean</i> (Abweichung vom Mittelwert)
SSB	<i>single-strand break</i> (Einzelstrangbruch)
SSC	<i>side scatter</i> (Seitwärtsstreulicht)
ssDNA	<i>single-stranded DNA</i> (Einzelstrang-DNA)
STAT	<i>Signal transducer and activator of transcription</i>
Tab.	Tabelle
TBS-T	<i>Tris-buffered saline with Tween20</i> (Tris-gepufferte Salzlösung mit Tween)
TGF β R	<i>transforming growth factor β receptor</i>
TNF	Tumornekrosefaktor
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
z. B.	zum Beispiel

Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung.....	1
2. Einleitung.....	3
2.1. Ewing-Sarkom	3
2.1.1. Definition	3
2.1.2. Epidemiologie.....	3
2.1.3. Symptome und Lokalisationen	3
2.1.4. Ätiologie	4
2.1.5. P53-Status.....	5
2.1.6. Prognose	6
2.1.7. Therapie	6
2.2. HSP90	7
2.2.1. Überblick	7
2.2.2. Struktur und Funktionsweise	8
2.2.3. Regulation	9
2.2.4. Physiologische und pathophysiologische Bedeutung.....	10
2.2.5. Bedeutung des Chaperoms.....	11
2.3. DNA-Schadensantwort und synthetische Letalität.....	13
2.4. Apoptose	14
2.5. P53	16
2.6. HSP90-Inhibitoren	18
2.6.1. Antitumoröse Effekte der HSP90-Inhibition	18
2.6.2. Entwicklung der HSP90-Inhibitoren.....	19
2.6.3. AUY922	20
2.7. ATM-Kinaseinhibitor KU-55933	22
2.8. ATR-Kinaseinhibitor VE-821.....	22
2.9. Topoisomerasen und Etoposid.....	23
3. Ziele der Arbeit.....	24

4. Material und Methoden	25
4.1. Materialien	25
4.1.1. Geräte und Arbeitsmittel.....	25
4.1.2. Allgemeine Reagenzien	26
4.1.3. Reagenzien für die Zellkultur.....	27
4.1.4. Reagenzien RIPA-Puffer	27
4.1.5. Reagenzien Western Blots	27
4.1.6. Reagenzien und Materialien PCR	28
4.1.7. Zelllinien	29
4.2. Methoden	30
4.2.1. Zellkultivierung	30
4.2.1.1. Anlegen einer Zellkultur.....	30
4.2.1.2. Passagieren der Zellen	30
4.2.1.3. Bestimmung der Zellzahl.....	31
4.2.1.4. Weiterführen der Kultur	31
4.2.2. Durchflusszytometrische Analysen.....	32
4.2.2.1. Prinzip der Durchflusszytometrie.....	32
4.2.2.2. Zelltod und mitochondriales Membranpotential.....	32
4.2.2.3. Anlegen der Wells und Behandlung der Zellen	33
4.2.2.4. Messung der Kompensation.....	34
4.2.2.5. Probenvorbereitung und Durchführung der Durchflusszytometrie...	35
4.2.2.6. Kombinationsindexanalyse.....	37
4.2.3. Western Blot.....	38
4.2.3.1. Herstellung der Lysate für Western Blots	38
4.2.3.2. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page).....	39
4.2.3.3. Western Blot und Immunodetektion der Proteine.....	40
4.2.4. Zellzyklusanalyse	41
4.2.5. Quantitative Echtzeit-PCR.....	43
4.2.5.1. Funktionsweise	43
4.2.5.2. RNA-Präparation.....	44
4.2.5.3. Photometrische Messung des RNA-Gehaltes und cDNA-Synthese	45
4.2.5.4. Echtzeit RT-PCR.....	46
4.2.5.5. Auswertung der PCR-Ergebnisse	46

5. Ergebnisse	48
5.1. FACS-Analysen	48
5.1.1. A673	49
5.1.2. WE-68	54
5.2. Zellzyklusanalysen	58
5.3. Western Blots	60
5.4. Echtzeit RT-PCR	66
5.4.1. Proapoptotische Proteine	66
5.4.2. TP53 und MDM2	69
5.4.3. CDKN1A.....	70
6. Diskussion	72
6.1. HSP90-Inhibitoren in pädiatrisch-onkologischen Fragestellungen	72
6.2. Synergismen von AUY922 und VE-821 oder KU-55933 in A673-Zellen	74
6.3. Sensibilisierung von Ewing-Sarkomzellen für DNA-Schäden durch Depletion von HSP90-Klientenproteinen	79
6.4. Induktion einer Hitze-Schock-Reaktion in Ewing-Sarkomzellen	81
6.5. Chaperome als potentielle therapeutische Zielstrukturen	82
7. Schlussfolgerungen.....	84
8. Literaturverzeichnis	86
9. Anhang.....	96
9.1. Abbildungsverzeichnis.....	96
9.2. Tabellenverzeichnis.....	97
9.3. Danksagung	98
9.4. Ehrenwörtliche Erklärung	99

1. Zusammenfassung

Als Ewing-Sarkom wird ein primärer maligner Knochentumor des Kindes- und Jugendalters bezeichnet. Es stellt eine aggressive Tumorentität dar und geht mit früher Systembeteiligung und daher schlechter Prognose im entsprechenden Patientenkollektiv einher; im Falle von Makrometastasen oder Rezidiven liegt die Überlebenswahrscheinlichkeit bei ca. 20 %. Aufgrund seiner Neigung zur frühen Dissemination ist die Chemotherapie ein wesentlicher Grundpfeiler in der Behandlung dieser Erkrankung. Allerdings wurden in den vergangenen 15 Jahren mit der Weiteroptimierung der bestehenden Chemotherapieprotokolle praktisch keine Behandlungsverbesserungen mehr erzielt, was die Entwicklung ganz neuer Therapiekonzepte nahelegt.

Eine vielversprechende neue Zielstruktur für zukünftige Pharmakotherapien stellt das Hitzeschockprotein HSP90 dar. Bei HSP90 handelt es sich um einen Knotenpunkt in der zellulären Proteinhomeostase und Signaltransduktion mit der Fähigkeit, extrinsische und intrinsische Stressfaktoren abzufangen. Am aussichtsreichsten erscheint dabei die Kombination mit weiteren Wirkstoffen, in der Erwartung, synergistische antineoplastische Effekte erzielen zu können. Einer der hier möglicherweise besonders relevanten Mechanismen könnte in der Erzeugung synthetischer Letalität durch die pharmakologische Blockierung von Signalwegen mit Funktion in der DNA-Reparatur liegen.

Wesentlicher Gegenstand dieser Promotionsarbeit waren Experimente zur Inhibition von HSP90 durch den Wirkstoff AUY922 in zwei Ewing-Sarkomzelllinien mit unterschiedlichem p53-Status, und zwar A673 (p53-null) und WE-68 (p53-Wildtyp). AUY922 wurde in Kombinationsversuchen zusammen mit Inhibitoren der zum DNA-Schadensantwort-System gehörenden Kinasen ATM und ATR sowie mit dem Zytostatikum Etoposid eingesetzt; ATM wurde mit KU-55933, ATR mit VE-821 gehemmt. Die daran anschließenden Messungen des Zelltodes und des Verlustes des mitochondrialen Membranpotentials wurden durchflusszytometrisch durchgeführt. Um die erzielten Ergebnisse auf eine synergistische Wirkung der Inhibitorkombinationen zu prüfen, wurde eine Kombinationsindexanalyse nach Chou-Talalay vorgenommen.

Die Prüfung zeigte Werte, die im Wesentlichen synergistische Effekte von AUY922 und den Kinaseinhibitoren in der Zelllinie A673, nicht aber in der Zelllinie WE-68 belegen.

Dieser Befund legt nahe, dass der Effekt aufgrund der beeinträchtigten DNA-Reparatur durch fehlendes p53 bei zusätzlicher Inhibition von ATM oder ATR und Induktion von DNA-Schäden mittels AUY922 in A673-Zellen zustande kam, es sich mithin um synthetische Letalität handelte. Die nach AUY922-Einzelbehandlung angefertigten Western Blots zeigten DNA-schädigende Effekte von AUY922 auf, wie auch eine Caspase 3-Aktivierung, was auf einen von AUY922 vermittelten apoptotischen Zelltodmechanismus hindeutet. Die Western Blots demonstrierten zudem einen Einfluss von AUY922 auf Proteine mit regulatorischer Funktion auf den Zellzyklus und Funktion in der DNA-Reparatur. Weitere Kombinationsbehandlungen und anschließende Echtzeit RT-PCR-Analysen zeigten außerdem Trends auf, nach denen die Apoptose in A673-Zellen im Gegensatz zu WE-68-Zellen auf einem von p53 unabhängigen Signalweg beruht.

Die vorliegenden In-vitro-Ergebnisse legen damit einen vielversprechenden neuen Ansatz für anschließende In-vivo-Versuche zur Therapie des prognostisch äußerst ungünstigen Ewing-Sarkoms mit mutiertem p53 dar. Weiterführende Fragestellungen zur Tumorselektivität von AUY922 wie auch zur Unterbindung einer Hitze-Schock-Antwort trotz HSP90-Inhibition könnten Themen zukünftiger Forschung sein.

2. Einleitung

2.1. Ewing-Sarkom

2.1.1. Definition

Die vierte WHO-Klassifikation der Weichteil- und Knochentumoren beschreibt das Ewing-Sarkom als klein- und rundzelliges Sarkom mit unterschiedlichen Ausprägungsgraden der neuroektodermalen Differenzierung (Pappo und Dirksen 2018). Diese Definition des EWS umfasst außerdem Tumoren, die vormals als primitive neuroektodermale Tumoren, Askin-Tumoren, periphere Neuroepitheliome und Tumoren der Ewing-Sarkom-Familie bezeichnet wurden. Es ist durch eine häufige balancierte Translokation zwischen dem EWSR1-Gen auf Chromosom 22 und Genen, die zur Familie der ETS-Transkriptionsfaktoren gehören, charakterisiert (Pappo und Dirksen 2018).

2.1.2. Epidemiologie

Das Ewing-Sarkom stellt mit einer Inzidenz 3/100000 pro Jahr den zweithäufigsten malignen Knochentumor im Kindes-, Jugend- und jungen Erwachsenenalter dar (Bolling et al. 2013). Die Erkrankung betrifft vorwiegend Patienten europäischer Herkunft, zu einem geringen Teil Asiaten und in seltenen Fällen auch Menschen mit schwarzer Hautfarbe und Chinesen, wobei männliche Personen mit einem Verhältnis von in etwa 1,5:1 häufiger betroffen sind als weibliche (Bolling et al. 2013).

2.1.3. Symptome und Lokalisationen

Klinische Anzeichen im Rahmen der Erkrankung äußern sich durch lokalisierte Schmerzen und durch eine sichtbare oder palpable Schwellung (Khoury 2005). Besonders bei Patienten mit fortgeschrittener Erkrankung können zusätzlich Fieber und Gewichtsverlust auftreten (Khoury 2005). 15 % der Patienten mit Tumorlokalisation in langen Röhrenknochen weisen zum Zeitpunkt der Diagnose außerdem eine Fraktur des Knochens auf (Khoury 2005). Die häufigsten primären Lokalisationen des Ewing-Sarkom stellen mit 47 % die Diaphysen der langen Röhrenknochen dar (Bolling et al. 2013).

Weiterhin befällt das Ewing-Sarkom in 26 % der Fälle die Knochen des Beckens, in 16 % der Fälle die Thoraxwand und in 6 % der Fälle die Wirbelsäule (Bolling et al. 2013). Obwohl das Ewing-Sarkom ursprünglich als primäres Sarkom des Knochens beschrieben wurde, können nicht selten extraskelettale Manifestationen u. a. in inneren Organen wie der Niere und dem Pankreas beobachtet werden (Lessnick und Ladanyi 2012).

2.1.4. Ätiologie

Definitionsgemäß findet sich in Zellen des Ewing-Sarkoms eine balancierte chromosomale Translokation, die das auf dem langen Arm des Chromosoms 22 (22q12) lokalisierte Gen EWS (EWSR1) einschließt und zur Entstehung eines Fusionsproteins führt, das als aberranter Transkriptionsfaktor agiert (Lessnick und Ladanyi 2012). In 90 % der Fälle findet eine Translokation und Fusion mit dem auf Chromosom 11 (11q24) befindlichen Gen FLI1 statt, in ca. 10 % der Fälle betrifft die Translokation das Gen ERG (21q22) (Lessnick und Ladanyi 2012). Weitere Translokationen sind beschrieben. Es wird angenommen, dass das entstehende Fusionsprotein ursächlich für Tumore der Ewing-Sarkom-Familie ist (Neilsen et al. 2011), indem der aberrante Transkriptionsfaktor zur Hoch- oder Herabregulation von mehreren hundert Zielgenen führt, deren Effekte sich im Wesentlichen in einer gesteigerten Proliferation und der Unterdrückung der Zelldifferenzierung zeigen (Kauer et al. 2009). Die verstärkte Repression bzw. Hochregulation von Zielgenen wird dabei zum Teil über weitere Regulatoren der Transkription wie NKX2.2 und NR0B1 mediiert (Lessnick und Ladanyi 2012). Als ein Beispiel für eine direkte Repression der Expression von Zielproteinen durch das Fusionsprotein EWS-FLI1 selbst sei hier das IGFBP-3 genannt. Die verminderte Synthese des Proteins führt zur erhöhten para- und autokrinen Verfügbarkeit von IGF-1 und damit zur Stimulation und Erhaltung der Zellproliferation (Lessnick und Ladanyi 2012). Das Ewing-Sarkom zeigt im Rahmen dieser transkriptionellen Deregulation auch erhöhte basale Transkriptionslevel, was sich durch eine Inhibierung der Funktion des als Regulator der Transkription agierenden EWSR1 durch EWS-FLI1 erklären lässt (Gorthi et al. 2018). Die überschießende Transkription führt zur Akkumulation von R-Schleifen, bestehend aus template-DNA, mRNA und non-template-DNA, zu denen BRCA1 rekrutiert wird (Gorthi et al. 2018).

Die dortige Sequestration dieses Reparaturenzyms führt anscheinend zu dessen funktioneller Abwesenheit und damit zu einer beeinträchtigten DNA-Reparatur im Sinne der homologen Rekombination von DSBs. Das Ewing-Sarkom teilt dadurch viele Eigenschaften der BRCA1-defizienten Tumore und weist vermutlich durch die Anwesenheit von EWS-FLI1 eine erhöhte Chemosensitivität – u. a. für Etoposid – auf (Gorthi et al. 2018). Letztlich wurden im Ewing-Sarkom zudem Herabregulationen bzw. Mutationen in Genen beschrieben, deren Proteinprodukte in der DNA-Schadensantwort involviert sind oder sogar direkt an der DNA-Reparatur beteiligt sind. Solches gilt für ATM und BRCA1. Dies weist zusätzlich auf eine defiziente DNA-Reparatur in Ewing-Sarkomzellen hin (Stewart et al. 2014, Westhoff et al. 2018).

2.1.5. P53-Status

Die Tatsache, dass p53 in mehr als der Hälfte aller Tumoren mutiert ist, unterstreicht die pathogenetische Relevanz für Tumorerkrankungen dieses als „Wächter des Genoms“ bekannt gewordenen Transkriptionsfaktors, der Prozesse wie Zellzyklusarrest und Apoptose initiiert (Bourdon et al. 2003, Freed-Pastor und Prives 2012). Im Gegensatz zu anderen soliden Tumoren liegt die Rate an Mutationen im p53-Gen in Ewing Sarkomen allerdings bei nur 10 %, während die restlichen 90 % einen p53-Wildtyp exprimieren (Neilsen et al. 2011). Damit weist das Ewing-Sarkom die niedrigste Rate an p53-Mutationen unter allen Sarkomtypen auf (Neilsen et al. 2011). Neben der mehrheitlichen Expression eines funktionstüchtigen p53 durch das EWS konnte ebenfalls die Integrität des p53-Signalweges in Ewing-Sarkomzellen nachgewiesen werden (Neilsen et al. 2011). Dabei hat das krankheitsdefinierende Fusionsprotein EWS-FLI1 die Eigenschaft, den Effekt von aktivem p53 durch indirekte Repression der Transkription oder direkte Protein-Protein-Interaktion abzuschwächen und dadurch die Proliferation in Gegenwart von DNA-Schäden voranzutreiben (Neilsen et al. 2011). Der Umstand, dass eine vorhandene p53-Mutation im Ewing-Sarkom signifikant häufiger mit intensiver Metastasierung und schlechterem Langzeitüberleben durch Chemotherapieresistenz verbunden ist, rückt die betroffene Patientenpopulation weiter in den Fokus der Bestrebungen, neue Therapien zu entwickeln (Neilsen et al. 2011).

2.1.6. Prognose

Während vor der Einführung der Chemotherapie in das multimodale Therapiekonzept aus Radiotherapie und operativem Vorgehen selbst im lokalisierten Stadium früher nur eine 5-Jahres Überlebensrate von 10 % erreicht werden konnte, liegt die durchschnittliche Überlebensrate heute bei 70 % (Ferreira et al. 2017).

Für Patienten mit Metastasen zum Zeitpunkt der Diagnose stellt sich die Prognose mit einer 5-Jahres Überlebensrate von 20 % weiterhin als sehr schlecht dar (Ferreira et al. 2017). Das Überleben von Patienten mit therapierefraktärem Ewing-Sarkom oder Rezidiv liegt darüber hinaus unter 10 % (Ferreira et al. 2017). Etwa 25 % der Patienten weisen zum Zeitpunkt der Erstdiagnose Metastasen auf, wobei diese zu 30 % die Lunge, zu 30 % Knochen oder Knochenmark und zu 20 % Lunge und Knochen bzw. Knochenmark betreffen (Pessetto et al. 2017). Neben der Metastasierung zum Diagnosezeitpunkt stellen eine Tumorlokalisierung im Achsenskelett, eine Tumorgroße von über 10 cm und ein Patientenalter von über 20 Jahren signifikante negative Prognosefaktoren dar (Duchman et al. 2015). Den stärksten prognostischen Faktor für das lokalisierte Ewing Sarkom stellt das histologische Ansprechen nach Induktionschemotherapie dar (Gaspar et al. 2015).

2.1.7. Therapie

Die Behandlung von Patienten mit Ewing-Sarkom sollte spezialisierten Zentren vorbehalten sein und innerhalb klinischer Studien erfolgen. Derzeitig beruhen die Therapieregimes auf einer Abfolge aus neoadjuvanter Chemotherapie, Lokaltherapie und adjuvanter Chemotherapie. Dabei stellt die Systemtherapie einen unverzichtbaren Baustein dar, was sich dadurch bestätigt, dass sich seit Einführung der Chemotherapie die Prognose in lokalisierten Stadien von einer 5-Jahresüberlebensrate von 10 % auf bis zu 70 % verbessert hat (Ferreira et al. 2017). Aktuell werden Patienten im Rahmen der multizentrischen europäischen Studie EWING 2008 in Risikogruppen eingeteilt und behandelt. Dabei erhalten alle Patienten eine Induktionschemotherapie aus sechs Zyklen der Zytostatikakombination aus Vincristin, Ifosfamid, Doxorubicin und Etoposid.

Die Lokaltherapie umfasst vorzugsweise eine chirurgische Resektion des Tumors inklusive Biopsiekanal innerhalb seines Kompartimentes unter Mitnahme der Pseudokapsel bis weit in gesundes Gewebe hinein, um den angestrebten R0 Status im Sinne mikroskopisch tumorfreier Resektionsränder zu erhalten. Bei marginaler Resektion durch die Pseudokapsel des Tumors hindurch und bei der zu vermeidenden intraläsionalen Resektion durch Tumorgewebe hindurch ist eine Bestrahlung aufgrund der hohen Wahrscheinlichkeit eines R1 oder R2 Resektionsstatus erforderlich.

Eine weitere Indikation für die postoperative Bestrahlung stellt das histologisch schlechte Ansprechen des Tumors auf die Induktionschemotherapie im Resektat dar. Eine alleinige Bestrahlung zur Lokaltherapie kann mit 55 Gy durchgeführt werden. Sie sollte allerdings nur bei inoperablem Befund durchgeführt werden, da die chirurgische Lokaltherapie demgegenüber mit einem signifikanten Überlebensvorteil assoziiert ist. Eine neoadjuvante Chemotherapie schließt sich risikoadaptiert an die Lokaltherapie an und umfasst acht Chemotherapiezyklen mit der Zytostatikakombination VAC (Vincristin, Actinomycin D, Cyclophosphamid) bzw. VAI (Vincristin, Actinomycin D, Ifosfamid). Bei Nichtansprechen der konventionellen Chemotherapie kann eine Hochdosischemotherapie beispielsweise mit Busulfan und Melphalan mit anschließender Stammzell-Rescue angewandt werden. Die Wirksamkeit dieser Alternative und weiterer Zusätze wie Zoledronsäure ist Gegenstand aktueller randomisierter Studien (Dirksen et al. 2012, Bolling et al. 2013, Dirksen und Jürgens 2014, Gaspar et al. 2015).

2.2. HSP90

2.2.1. Überblick

Das HSP90 ist ein hochkonserviertes, ubiquitär vorkommendes Protein mit essenzieller Funktion für die Protein-Homöostase der Zelle (Barrott und Haystead 2013). Es wird als 90 kDa großes Protein in den zwei verschiedenen Isoformen HSP90 α und HSP90 β exprimiert und stellt einen – relativ zu anderen Proteinen gesehen – hohen Anteil am Gesamtproteingehalt der Zelle mit 1-3 % (Barrott und Haystead 2013).

Als sogenanntes Chaperon verhilft es ungefalteten Proteinen in ihre aktive Form, unterstützt die Assemblierung von Multiproteinkomplexen, fördert die Ligandenbindung und stabilisiert Proteine unter sich ändernden Umweltbedingungen. Letztere Funktion im Rahmen der Hitzeschock-Antwort bei steigender Temperatur brachte HSP90 aufgrund seiner unter diesen Umständen stark erhöhten Expression seinen Namen ein (Schopf et al. 2017).

2.2.2. Struktur und Funktionsweise

HSP90 liegt in vivo als Homodimer vor, wobei die Dimerisierung beider Monomere Voraussetzung für dessen aktiven Zustand ist (Schopf et al. 2017). Die Monomere bestehen aus einer für die ATP-Bindung zuständigen aminoterminalen Domäne, die über eine flexible Linkerregion mit einer für die ATP-Hydrolyse und Bindung der Substrate notwendigen Mitteldomäne verbunden ist und über diese in eine carboxyterminale Domäne mündet, die der Dimerisierung dient. Außerdem weist das carboxyterminale Ende eine Sequenz aus den Aminosäuren Met-Glu-Glu-Val-Asp auf, welche die Bindung von Co-Chaperonen mit Tetratricopeptid-Domänen ermöglicht (Miyata et al. 2013). Solche Co-Chaperone funktionieren im Komplex mit HSP90 als Regulatoren für dessen Substratspezifität und Reaktionsgeschwindigkeit. Durch Bindung von ATP an die aminoterminalen Domäne werden die der Lid-Region zugehörigen Aminosäuren neu arrangiert, um die Bindungstasche zu schließen und HSP90 so in den intermediären Zustand zu führen. Dieser Zustand induziert zunächst die Dimerisierung der aminoterminalen Enden im ersten Teil des geschlossenen Zustandes und weiterhin die Anlagerung dieser dimerisierten Enden an die Mitteldomänen, gefolgt von deren Verwindung im zweiten Teil des geschlossenen Zustandes. Durch diese Interaktion wird die katalytisch aktive Region der Mitteldomäne neu positioniert und die ATP-Hydrolyse kann stattfinden. Nach der Spaltung des gebundenen ATPs dissoziieren die aminoterminalen Enden wieder voneinander und ADP sowie organisches Phosphat werden freigegeben, um HSP90 wieder in den Zustand der offenen, V-förmigen Konformation zurückzuführen (Schopf et al. 2017).

2.2.3. Regulation

Die Regulation von HSP90 erfolgt auf Ebene der Transkription, der posttranslationalen Modifikation und auf Ebene der Protein-Protein-Interaktion mit Co-Chaperonen (Prodromou 2017). Der Hauptregulator der Transkription innerhalb der Hitze-Schock-Antwort ist HSF1, dessen Aktivität unter regulären Bedingungen durch die Bindung an HSP90 unterdrückt wird. Bei zellulärem Stress durch Hyperthermie, Schwermetalle, reaktive Sauerstoffspezies, bakterielle oder virale Infektionen sowie pharmakologische Beeinflussung wird diese Bindung aufgrund verminderter Konzentrationen an HSP90 aufgelöst, gelöstes HSF1 bildet Homotrimere und erhält auf diese Weise die Bindungsaffinität zu DNA mit Hitze-Schock-Elementen (Prodromou 2017). Zusätzlich zur Trimerisierung wird HSF1 an mehreren Stellen phosphoryliert, was weitere, durch Stress beeinflusste Signalwege in die Aktivierung von HSF1 einfließen lässt, wie zum Beispiel die Phosphorylierung von Serin S230 durch CaMKII (Anckar und Sistonen 2011). Weitere Mechanismen der Aktivierung wurden beschrieben. Aktives HSF1 steigert die Expression von HSP90, HSP70 und zahlreicher Co-Chaperone (Anckar und Sistonen 2011, Prodromou 2017). Posttranslationale Modifikationen umfassen Phosphorylierungen, Acetylierungen, Sumoylierungen und S-Nitrosylierung, die einen vorwiegend negativ regulatorischen Effekt auf die ATPase-Aktivität, Reifung der Klientenproteine und Interaktion mit Co-Chaperonen haben. Zusätzlich dazu schaffen diese posttranslationalen Modifikationen Angriffspunkte für weitere allosterische Regulatoren der Kommunikation zwischen den Domänen von HSP90 (Schopf et al. 2017). Die Interaktion zwischen Co-Chaperonen und HSP90 stand in den letzten zwei Jahrzehnten im Fokus intensiver Forschungsarbeiten. Diese Proteine binden HSP90 abhängig von dessen Konformationszustand und bedingen sowohl eine reguläre Funktion des Proteins als auch die Erkennung der passenden Substrate und die Anpassung der Enzymaktivität (Barrott und Haystead 2013). Die vorherrschende Klasse an Co-Chaperonen sind solche mit Tetratricopeptid-Domänen. Zu diesen zählen CHIP, Hop, Cyclophilin 40, das FK506-binding protein und PP5. Diese Proteine helfen bei der Rekrutierung neuer Substrate und steigern teilweise die enzymatische Aktivität für Isomerasen, Phosphatasen und Ligasen (Barrott und Haystead 2013). Zu den Co-Chaperonen mit anderen Bindungsdomänen gehören Aha1, Cdc37 und p23. Während die ATPase-Aktivität durch Hop, p23 und Cdc37 inhibiert wird, stellt Aha1 einen Aktivator dieser Enzymaktivität dar.

Cdc37 verhilft HSP90 zur Bindung von ca. zwei Dritteln des kompletten zellulären Kinoms und stellt durch die Bindung von mutierten Kinasen einen möglichen Treiber der Tumorgenese dar. P23 seinerseits weist im Komplex mit HSP90 eine große Breite an Substraten auf, stellt aber ebenso ein wichtiges Co-Chaperon für die Bindung von nukleären Hormonrezeptoren dar (Barrott und Haystead 2013).

2.2.4. Physiologische und pathophysiologische Bedeutung

HSP90 nimmt eine Schlüsselrolle innerhalb der Proteinhomöostase unter physiologischen und pathophysiologischen Bedingungen ein. Es bewirkt die Faltung und Aktivierung seiner Substrate, die Assemblierung von Multiproteinkomplexen und die Bindung von Liganden an ihre Rezeptoren (Schopf et al. 2017). Es puffert schädliche Einwirkungen ab, indem es die Reparatur oder Neusynthese geschädigter Proteine sicherstellt und bedingt einen funktionierenden intrazellulären Proteintransport. Es hat zudem einen Einfluss auf die epigenetischen Regulierungen der Transkription und des Chromatinzustandes (Mazaira et al. 2017) und trägt darüber hinaus seinen Teil zur DNA-Reparatur und Zellzyklusregulation, zur Apoptose, zu Entwicklung und Differenzierung, zu Lipid- und Kohlehydratstoffwechsel und zur Immunantwort bei (Echeverria et al. 2011). Die Diversität in der Funktion dieses Chaperons wird bedingt durch die Interaktion mit mehreren hundert Klienten, wobei sich unter diesen 60 % aller Kinasen, ca. 7 % aller Transkriptionsfaktoren und etwa 30 % aller E3 Ubiquitin-Ligasen befinden (Taipale et al. 2012, Schopf et al. 2017). Obwohl eine ausführliche Beschreibung der vielfältigen Funktionen und damit der mehreren hundert Klientenproteine das Ausmaß dieser Arbeit bei weitem überschreiten würde, möchte ich hier der Vollständigkeit halber dennoch auf das Verzeichnis dieser Proteine hinweisen, das von Prof. Didier Picard, Universität Genf, unterhalten wird.

Unter den pathophysiologischen zellulären Zuständen während der Tumorentstehung kommt dem HSP90 eine zentrale Rolle in der Entwicklung und Aufrechterhaltung der Merkmale von Neoplasien zu (Miyata et al. 2013).

Zu diesen im Jahre 2000 postulierten und mittlerweile anerkannten Merkmalen gehören dauerhafte unterhaltene zelluläre Proliferationsstimuli, die Resistenz gegenüber wachstumsunterdrückenden Signalen, Gewebsinvasion und Metastasierung, Immortalisierung, Induktion der Angiogenese und Unterdrückung der Apoptose (Hanahan und Weinberg 2000).

Außerdem wurden mit wachsendem Verständnis von Tumorerkrankungen die Merkmale der Immunevasion und des entgleiten zellulären Metabolismus ergänzt (Hanahan und Weinberg 2011).

Es bildete sich heraus, dass insbesondere die proliferierenden Tumorzellen aufgrund der Interaktion von HSP90 mit den für die oben genannten Prozesse im Tumorprogress bedeutsamen Proteinen von selbigem abhängig sind.

Es wird angenommen, dass die Akkumulation von fehlerhaften Klientenproteinen dabei über festere Bindungen den Anteil an zur Verfügung stehendem HSP90 verringern könnte, sodass diese Zellen demzufolge auch sensibler auf HSP90-Inhibitoren reagieren als normale Zellen (Miyata et al. 2013). Darüber hinaus bedingen aberrante Phosphorylierungen, posttranslationale Modifikationen und die Bildung von Komplexen mit Onkogenen möglicherweise einen Zustand mit erhöhter Affinität zu ATP bzw. Inhibitoren an der ATP-Bindungsstelle und sogar eine veränderte Lokalisation des Chaperons (Barrott und Haystead 2013, Miyata et al. 2013). Die ektope Lokalisation von HSP90 auf der Zellmembran und im Extrazellulärraum von Tumorzellen weist auf einen besonders malignen Phänotyp von Neoplasien hin. Eine mögliche Erklärung dafür liegt in der aktivierenden Interaktion von extrazellulärem HSP90 mit der MMP-2, wodurch Metastasierung in Invasion deutlich verstärkt werden könnten (Eustace et al. 2004). Zuletzt entsteht in Tumorzellen aufgrund der erhöhten metabolischen Aktivität weiterhin ein Zustand, der von Nährstoffdeprivation, Hypoxie und erhöhter Temperatur geprägt wird und einer Hitze-Schock-Antwort durch HSP90 benötigt. Es konnte dabei gezeigt werden, dass sich diese Induktion der Hitze-Schock-Antwort in verschiedenen Tumorentitäten in einem um das zwei- bis dreifache erhöhtem Gehalt an HSP90 in Krebszellen gegenüber dem entsprechenden benignen Gewebe widerspiegelt. Die Überexpression von HSP90 im Tumorgewebe konnte dabei mit einer schlechten Prognose im Sinne des Gesamtüberlebens in Verbindung gebracht werden (Barrott und Haystead 2013).

2.2.5. Bedeutung des Chaperoms

Der aus dem Jahre 2006 stammende Begriff des Chaperoms bezeichnet eine Ansammlung von Chaperonen, zu denen unter anderem HSP90 und HSP70 gezählt werden, sowie Co-Chaperonen und weiteren Faktoren (Joshi et al. 2018).

Dieser Zusammenschluss aus Chaperonen dient entsprechend seiner Grundbestandteile, den Hitze-Schock-Proteinen und assoziierten Proteinen, sowohl der Proteinhomeostase unter physiologischen Bedingungen als auch der Aufrechterhaltung eines funktionierenden Proteinhaushaltes unter pathophysiologischen Bedingungen. Die in Krebszellen durch eine gesteigerte Proteinsynthese stattfindende Missfaltung und Aggregation von Proteinen, der erhöhte Anfall reaktiver Sauerstoffspezies, Wachstum unter Hypoxie und saurem pH-Wert und eine durch Aneuploidie veränderte Proteinstöchiometrie bedingen als solche pathophysiologischen Voraussetzungen eine Hitze-Schock-Reaktion, die allerdings nur ca. ein Fünftel des zellulären Chaperoms induzieren kann (Joshi et al. 2018). Neben dem Konzentrationsanstieg von Chaperomkomponenten führt chronischer Stress über eine Imbalance im zellulären Proteom zur Steigerung der Konnektivität zwischen einzelnen Chaperomen wie dem HSP90- und dem HSP70-Chaperom. Diese Oligomerisierung von Chaperomen führt verglichen mit den einzelnen Chaperom-Untereinheiten zu einer erhöhten Funktionalität und vermutlich zu einer Aktivierung von Funktionen der Hitze-Schock-Proteine, die unter physiologischen Bedingungen nicht wahrgenommen werden und möglicherweise die Aufrechterhaltung von Signalwegen ermöglichen, die Malignität verursachen (Joshi et al. 2018). Beispiele hierfür sind die Interaktion von HSP90-Komplexen mit BCR-ABL und STAT5 in CML-Zellen (Moulick et al. 2011), JAK2-STAT3 in Ovarial- und Endometriumkrebszellen (Tsai et al. 2016) oder STAT5 in AML-Zellen (Zong et al. 2015). Joshi et al. schlagen eine Einteilung von Tumoren anhand deren Chaperomkonnektivität vor:

Typ 1-Tumoren weisen demnach eine besonders hohe Konnektivität von HSP90- und HSP70-Chaperomen auf, was zur Erschließung weiterer Funktionen führt, allerdings eine geringere Redundanz von Funktionen zur Folge hat. Ein Funktionsausfall von HSP90 kann demnach nicht durch HSP70 kompensiert werden, was zu einer erhöhten Toxizität durch Einzelbehandlung mit HSP90-Inhibitoren führt. Typ 2-Tumoren zeigen im Gegensatz eine geringe Konnektivität beider Chaperome, was eine Redundanz der Funktionen und damit eine Kompensation des Funktionsverlustes von HSP90 durch das HSP70-Chaperom mit konsekutiv geringerer Toxizität bei alleiniger HSP90-Inhibition zur Folge hat.

Die Einteilung der Tumoren nach Grad der Konnektivität zwischen HSP90- und HSP70-Chaperomen und dem damit einhergehenden unterschiedlichen Ansprechen auf HSP90-Inhibition könnte damit eine Erklärung der teilweise enttäuschenden Ergebnisse von HSP90-Inhibitoren in Studien mit nicht nach dieser Einteilung selektierten Patienten liefern (Joshi et al. 2018).

2.3. DNA-Schadensantwort und synthetische Letalität

Um die sowohl durch extrinsische als auch intrinsische Faktoren vermittelte genomische Instabilität zu überleben, haben alle Organismen Strategien zur Erhaltung einer intakten DNA entwickelt (Blackford und Jackson 2017).

DNA-Schädigungen können dabei unter anderem durch fehlerhafte Replikation der DNA, alkylierende Substanzen, UV-Licht, chemische Reaktionen, ionisierende Strahlung oder beispielsweise reduzierte Aktivität der Topoisomerasen mit Bildung von Einzel- und Doppelstrangbrüchen entstehen (Blackford und Jackson 2017). Ein für Tumorzellen besonders relevanter Mechanismus der Entstehung von Doppelstrangbrüchen stellt dabei der durch aktivierte Onkogene begünstigte replikative Stress dar (Halazonetis et al. 2008, Murga et al. 2011). Ungeachtet der Ursache derartiger Schädigungen des Genoms folgt jenen eine DNA-Schadensantwort, welche durch Sensoren, Signaltransduktoren und Effektoren orchestriert wird (Marechal und Zou 2013). Eine herausragende Rolle als Signaltransduktoren der DNA-Schadensantwort nehmen die Kinasen ATM, ATR und DNA-PK ein, die zu den Serin/Threonin-Kinasen und zur phosphatidylinositol-3-kinase-like kinase Familie (PIKKs) gehören (Marechal und Zou 2013).

Diese Kinasen werden durch Proteine, die als Sensoren fungieren, an Orte der DNA-Schädigung rekrutiert und dort nach Bindung des Sensors autophosphoryliert. Bei ATM findet dies vorrangig an DSBs durch MRN (Mre11-Rad50-Nbs1) statt (Marechal und Zou 2013). Die folgende Aktivierung des ATM-Signalweges schiebt über Effektorproteine wie CHK2, p53 und Brca1 Zellzyklusarrest, DNA-Reparatur und Apoptose an (Marechal und Zou 2013). Weiterhin phosphoryliert ATM in Anwesenheit von DSB das flankierende Histon (H2AX), welches seinerseits zur Rekrutierung weiterer Proteine der DNA-Schadensantwort und DNA-Reparatur beiträgt und als pH2AX zur Feststellung von DNA-Schädigungen in Form von Doppelstrangbrüchen gemessen werden kann (Rogakou et al. 1998, Lavin 2008).

ATR wird demgegenüber neben DSB von einer Vielzahl weiterer Schädigungen aktiviert. Eine Schlüsselrolle scheint dabei allerdings ssDNA einzunehmen, die durch Effektorproteine von ATM nach dessen Aktivierung generiert wird und zum sogenannten ATM-ATR-Wechsel beiträgt (Marechal und Zou 2013). ATR wird dann durch ATRIP an diese durch Replikationsprotein A (RPA) umhüllten Enden der ssDNA rekrutiert und aktiviert. Elemente im ATR-Signalweg sind beispielsweise Rad51, das zur homologen Rekombination und damit Reparatur gebraucht wird, und CHK1, dem eine große Bedeutung bei der Aktivierung von S-Phasen- und G₂/M-Kontrollpunkten zukommt und damit zur Arretierung der Zelle am Phasenübergang beiträgt, um DNA-Reparatur zu ermöglichen (Marechal und Zou 2013, Saldivar et al. 2017).

Viele maligne Entitäten sind durch eine genomische Instabilität, die aus dem Verlust bestimmter Reparaturmechanismen wie der homologen Rekombination resultieren, gekennzeichnet (Blackford und Jackson 2017). Als Konsequenz daraus werden vormals nicht essenzielle Signalwege der DNA-Schadensantwort zur Reparatur der entstandenen Schäden für diese Zellen überlebenswichtig. Die Inhibierung dieser übrigen Signalwege in Zusammenschau mit dem Verlust vorheriger Reparaturmechanismen führt zur sogenannten synthetischen Letalität der Zelle und macht Inhibitoren der Proteine der PIKK-Familie wie ATM und ATR zu vielversprechenden neuen pharmakologischen Zielen (Blackford und Jackson 2017).

2.4. Apoptose

Der Begriff der Apoptose oder auch des programmierten Zelltodes benennt einen energieabhängigen und kontrolliert ablaufenden zentralen Prozess zur Aufrechterhaltung eines Gleichgewichtes zwischen Zellteilung und Zelluntergang (Elmore 2007). Die Apoptose stellt dabei einen eigenständigen und sowohl zellmorphologisch als auch biochemisch als Apoptose identifizierbaren Vorgang des Absterbens einer oder mehrerer Zellen dar. Dieser Prozess trägt unter physiologischen Bedingungen unter anderem dazu bei, den Untergang alternder und zu ersetzender Zellen zu bewerkstelligen, die initial überschießende Zellteilung im Rahmen der Wundheilung oder einer Immunantwort auf ein funktionelles Maß zu reduzieren und die Umformung von Zellverbänden im Laufe der Embryonalentwicklung des Menschen zu ermöglichen. Pathophysiologisch birgt ein gesteigerter oder übermäßiger Grad an Apoptose einen Bestandteil oder gar Voraussetzung einiger Krankheitsbilder.

Während gesteigerte Apoptose beispielsweise Bedeutung innerhalb neurodegenerativer Erkrankungen, Ischämien oder von AIDS erlangte, stellt die reduzierte Apoptose als Merkmal von Neoplasien eine Voraussetzung für die Entstehung ebendieser dar (Elmore 2007).

Der programmierte Zelltod kann sowohl durch extrinsische als auch intrinsische Signalwege eingeleitet werden (Elmore 2007). Der extrinsische Weg wird durch Ligandenbindung an Transmembranrezeptoren der TNF-Rezeptorfamilie wie beispielsweise FasL/FasR aktiviert und führt über die Rekrutierung weiterer Adapterproteine zum aktivierten Rezeptor zur Bildung des DISC, der die autokatalytische Aktivierung der Initiatorcaspase 8 ermöglicht.

Ein weiterer extrinsischer Weg der Apoptose wird durch die Granzyme der T-Zellen angeschoben und kann die Apoptose sowohl über Caspasen und die Permeabilitätserhöhung der äußeren Mitochondrienmembran als auch unabhängig von diesen Strukturen vermitteln (Elmore 2007).

Die intrinsische Kaskade der Apoptose kann durch die Entfernung von für das Zellüberleben notwendigen, positiven Signalen durch Wachstumsfaktoren, Hormone und Zytokine oder aber durch vermehrt anfallende negative Faktoren wie DNA-Schädigung, Hitze, ionisierende Strahlung, Hypoxie, freie Radikale oder Virusinfektionen getriggert werden (Saelens et al. 2004).

Die Reaktion auf diese Veränderung spiegelt sich in Veränderungen der Mitochondrienmembran im Sinne einer erhöhten Permeabilität wider. Das Resultat daraus ist ein Verlust des mitochondrialen Membranpotentials zum einen und zum anderen eine Freisetzung von proapoptotischen Proteinen aus dem Intermembranraum (Saelens et al. 2004). Zu diesen Proteinen gehört unter anderem Cytochrom c, das zusammen mit Apaf-1 und der Caspase 9 das Apoptosom bildet und zur Aktivierung der Initiatorcaspase-9 führt. Ein weiterer, in diesem Zusammenhang aus den Mitochondrien freigesetzter, Faktor, der die Apoptose vorantreibt, ist AIF (Elmore 2007). Sowohl der extrinsische als auch der intrinsische Signalweg münden beide in die definitive Ausführung des programmierten Zelltodes. Der Beginn dessen ist zunächst gekennzeichnet durch eine Spaltung und Aktivierung der Effektorcaspasen 3, 6 und 7 durch die Initiatorcaspasen (Slee et al. 2001).

Die anscheinend wichtigste dieser Effektorcaspasen ist die Caspase 3, die durch die Aktivierung einer Endonuklease die Fragmentierung der DNA antreibt und darüber hinaus zytoskelettale Veränderungen und die Bildung phagozytierbarer Apoptosekörperchen ermöglicht (Elmore 2007). Das DNA-Reparaturenzym PARP, das normalerweise an der Erkennung und Behebung von SSBs beteiligt ist, wird ebenfalls durch die Caspase 3 gespalten und fällt im Rahmen der Apoptose in dieser gespaltenen Form vermehrt an (Boulares et al. 1999, Morales et al. 2014). Das Protein AIF wirkt im Rahmen der Apoptose unabhängig von Caspasen und führt seine Funktion aus, indem es die DNA-Degradation und Chromatin-Kondensation forciert und die Proteinsynthese inhibiert (Bano und Prehn 2018).

Die Apoptose unterliegt der Regulierung durch Proteine der BCL-2-Familie. Man nimmt an, dass diese Proteine die Freisetzung von Cytochrom c durch Veränderung der Mitochondrienpermeabilität beeinflussen und auf diese Weise den Prozess der Apoptose forcieren oder wieder abbrechen können (Elmore 2007). Man unterscheidet dementsprechend proapoptotische Effektorproteine BAX und BAK, die nach ihrer Oligomerisierung die Permeabilität der äußeren Mitochondrienmembran steigern, von antiapoptotischen Faktoren wie BCL-2, BCL-xL oder MCL-1, die durch Bindung von BAX und BAK deren Aktivierung verhindern und proapoptotische Faktoren wie BAD, BIM, PUMA und NOXA, die BAX und BAK direkt aktivieren oder diese beiden Faktoren aus der Bindung durch anti-apoptotische Proteine befreien und so eine Oligomerisierung ermöglichen (Correia et al. 2015).

2.5. P53

Unter physiologischen Bedingungen liegen nur sehr geringe intrazelluläre Proteinkonzentrationen an p53 vor. Dies liegt daran, dass p53 als Transkriptionsfaktor die Hochregulation seiner eigenen Ubiquitin-Ligase – MDM-2 – stimuliert und dadurch einer ständigen Polyubiquitinilierung und damit dem proteasomalen Abbau unterliegt. Außerdem vermag MDM-2 die Aktivität von p53 als Transkriptionsfaktor direkt zu inhibieren (Smeenk und Lohrum 2010). Kommt es zu zellulärem Stress, beispielsweise durch Schädigungen der DNA, erfährt p53 stabilisierende und aktivierende posttranslationale Modifizierungen. Die wichtigsten dieser posttranslationalen Modifizierungen stellen Phosphorylierungen dar, die unter anderem durch die Kinasen ATM, CHK1 und CHK2 vorgenommen werden.

Eine Phosphorylierung am Serin 15 bewirkt dabei eine Stabilisierung von p53, indem es die Bindung von MDM-2 an den Tumorsuppressor behindert und führt zu einer Steigerung der transkriptionellen Aktivität (Smeenk und Lohrum 2010). Eine Vielzahl an Genen erfährt anschließend eine Hochregulation durch aktives p53. Eines der am besten untersuchten Zielgene von p53 ist dabei p21, dessen Genprodukt den gleichnamigen CDK-1-Inhibitor stellt. Dieser kann eine Hypophosphorylierung von Rb1 mit konsekutivem Zellzyklusarrest am G1-Kontrollpunkt herbeiführen und durch diesen passageren Effekt eine DNA-Reparatur ermöglichen (Smeenk und Lohrum 2010). Des Weiteren kann p53 über die Transkription weiterer Proteine zum G2-Arrest beitragen (Smeenk und Lohrum 2010). Sind die DNA-Schäden jedoch irreparabel, stellt die Apoptose die drastischste Folge einer Akkumulation von aktivem p53 dar (Smeenk und Lohrum 2010). P53 leitet dabei hauptsächlich Veränderungen ein, die dem intrinsischen Signalweg der Apoptose entsprechen. Nukleäres p53 induziert im Rahmen der Apoptose die Gene von PUMA, NOXA und BAX. PUMA ermöglicht neben seiner direkten Bindung der Proteine BAX und BAK anschließend die Freisetzung von im Zytosol als Komplex mit BCL-xL vorliegendem p53, welches wiederum zur Oligomerisierung von BAX und dessen Translokation in die mitochondriale Membran zur Permeabilitätssteigerung verhilft (Amaral et al. 2010, Correia et al. 2015).

PUMA kann darüber hinaus allerdings auch über vom p53-Signalweg unabhängige Mechanismen hochreguliert und aktiviert werden (Zhang et al. 2013). Selbiges trifft für NOXA zu, dessen Induktion ebenfalls auch ohne p53 stattfinden kann (Zhang et al. 2013). Die proapoptotische Funktion von NOXA wird aktuell diskutiert und sowohl in der Bindung von antiapoptotischem MCL-1 und der direkten Aktivierung von BAX und BAK vermutet (Correia et al. 2015). Mitochondriales p53 induziert zusätzlich durch die Inhibierung der antiapoptotischen Faktoren BCL-2 und BCL-xL die Oligomerisierung von BAX und BAK mit anschließender Membrantranslokation und trägt über die Bildung von p53-Cycophylin D-Komplexen zur Disruption der mitochondrialen Membranintegrität bei (Amaral et al. 2010).

2.6. HSP90-Inhibitoren

2.6.1. Antitumoröse Effekte der HSP90-Inhibition

Die Inhibierung des Chaperons HSP90 führt indirekt über die Destabilisierung seiner Klientenproteine zu einer Beeinträchtigung vieler zellulärer Prozesse und Signalwege – einschließlich derer, die an der Tumorgenese beteiligt sind (Miyata et al. 2013). Da die Inhibierung von HSP90 prinzipiell aber eine Auswirkung auf alle Klientenproteine hat, soll hier nur auf eine kleinere Anzahl onkologisch relevanter Faktoren im Rahmen der weiter oben beschriebenen Merkmale von Neoplasien eingegangen werden.

HSP90 interagiert mit einem breiten Spektrum zellulärer Kinasen, von denen viele als Onkogene – also als Proteine, deren aberrante Aktivierung zur Tumorentstehung beitragen – beschrieben worden sind (Miyata et al. 2013). Die durch diese Kinasen angeschobenen Wachstumsreize sind dementsprechend indirekt auch durch HSP90 bedingt und können durch Inhibitoren des Chaperons unterdrückt werden. Wachstumsreize können dabei beispielsweise durch Zelloberflächenrezeptoren und HSP90-Klienten wie ERbB2/HER2, IGF-1R oder TGFβR 1 und 2 nach Bindung extrazellulärer Liganden in das Zellinnere getragen werden. Eine Alternative bietet sich durch die bei Aktivierung an die membranständigen Rezeptoren rekrutierten Tyrosinkinasen der Src-Familie wie das Fusionsprotein BCR-ABL. Sie können anschließend weitere Elemente in der Signalkaskade des Wachstums aus der Familie der Raf-Kinasen aktivieren und schließlich über MAPK's wie ERK1 und ERK2 zur Phosphorylierung und Aktivierung nukleärer Transkriptionsfaktoren für Wachstums- und Proliferationsgene führen (Miyata et al. 2013). Diese Wachstumsreize können durch HSP90-Inhibitoren abgeschwächt werden (Miyata et al. 2013). Auch das Protoonkogen c-Myc, das unter physiologischen Bedingungen als Transkriptionsfaktor unter anderem Proliferation und Differenzierung steuert, allerdings bei Überexpression und Deregulation einen Treiber der Tumorgenese darstellt, kann durch Inhibition von HSP90 depletiert werden (Regan et al. 2011, Chen et al. 2014a, Poole et al. 2018). Selbiges gilt für die Rezeptor-Tyrosinkinase c-Kit, die in ihrer mutierten Form eine wichtige Rolle in der Entstehung bestimmter Tumorentitäten spielt (Lin et al. 2008, Abbaspour Babaei et al. 2016).

Neben den sich selbst erhaltenden Wachstumsreizen bildet eine Fehlfunktion der Klientenproteine mit regulatorischer Wirkung im Zellzyklus wie CDK4, CDK6 und Cyclin D eine Voraussetzung für mangelndes Ansprechen auf Signale mit wachstumshemmendem Charakter und gibt Tumoren durch Verstärkung der Telomeraseaktivität ein erhöhtes replikatives Potential (Xu und Neckers 2007). Letzteres wird zudem bedingt durch das Enzym nTERT, welches die katalytische Untereinheit der Telomerase und darüber hinaus einen HSP90-Klienten darstellt, der durch seine Aktivität die Erhaltung der Telomere sicherstellt, damit der Seneszenz entgegenwirkt und zur Immortalisierung von Tumorzellen beiträgt (Xu und Neckers 2007, Miyata et al. 2013). Eine Folge der Inhibition von HSP90 ist damit auch die reduzierte Telomeraseaktivität und folglich ein verringertes replikatives Potential von Tumorzellen (Xu und Neckers 2007). Auch die Eigenschaften der Neovaskularisation, Metastasierung und Invasion in anderes Gewebe werden durch HSP90-Inhibitoren durch die verminderte Synthese und erhöhte Degradation von VEGF und HIF1A sowie die verminderte Aktivität der extrazellulären MMP-2 kompromittiert (Xu und Neckers 2007, Mahalingam et al. 2009). HSP90-Inhibitoren haben nicht zuletzt auch das Potential, die Apoptose als einen der wichtigsten Regulatoren physiologischen Zellwachstums zu stimulieren, da in malignen Zellen die HSP90-Klientenproteine IGF-1, IGF-1R über eine verstärkte Expression antiapoptotischer Proteine der BCL-2-Familie wie BCL-2 und BCL-xL und der verminderten Expression proapoptotischer Proteine wie BIM das Überleben der Zelle fördern (Xu und Neckers 2007).

2.6.2. Entwicklung der HSP90-Inhibitoren

Die Entwicklung synthetischer, zielgerichteter Inhibitoren von HSP90 basierte auf der Entdeckung und Isolierung der natürlich vorkommenden Substanzen Radicicol aus *Monosporium bonorden* im Jahre 1953 und Geldanamycin aus *Streptomyces hygroscopicus* im Jahre 1970 (Delmotte und Delmotte-Plaque 1953, DeBoer et al. 1970). Beide Substanzen gehen einen kompetitiven Antagonismus mit ATP in der N-terminalen Nukleotidbindungstasche des Chaperons ein, verhindern die Bindung und Hydrolyse von ATP und führen damit konsekutiv zur Ubiquitinierung und Depletion von Klientenproteinen von HSP90 (Roe et al. 1999, Sidera und Patsavoudi 2014).

Trotz der antitumorösen Effekte konnten sich diese Stoffe aufgrund schwerer hepatotoxischer Nebenwirkungen, Instabilität der Moleküle in vivo und schlechter Wasserlöslichkeit nicht für weitere klinische Anwendung auszeichnen. In Folge dessen wurden Derivate der natürlichen Produkte wie 17-AAG und 17-DMAG synthetisiert und erforscht (Sidera und Patsavoudi 2014). Durch die weiterhin bestehende Notwendigkeit der Verbesserung der klinischen Wirksamkeit und der Reduktion der Nebenwirkungen wurde letztlich die Brücke zur Entwicklung einer neuen Klasse von niedermolekularen Inhibitoren geschlagen. Diese synthetischen Moleküle lassen sich den beiden Substanzklassen der Puringerüst-Inhibitoren und der Inhibitoren mit Verwandtschaft zu resorzyklischen Pyrazolen bzw. Isoxazolen zuordnen. Zur letzteren Substanzklasse der resorzyklischen Isoxazole gehört der in dieser Arbeit untersuchte und experimentell verwendete HSP90-Inhibitor AUY922 (Sidera und Patsavoudi 2014). Das dabei initial festgestellte Wirkprinzip des ATP-Antagonismus blieb dabei bei erhöhter Affinität zur ATP-Bindungsstelle von HSP90 weiterhin erhalten (Whitesell und Lin 2012).

2.6.3. AUY922

Es konnten spezifische Charakteristika des Inhibitors AUY922 beschrieben werden. Dabei wirkte das Molekül auf diverse Tumorarten mit unterschiedlichen onkogenen Profilen sowohl in vitro auf Zellkulturen als auch in vivo in Maus-Xenograftmodellen zytostatisch, proapoptotisch und supprimierend auf Angiogenese und Tumorzellinvasion (Eccles et al. 2008). Bereits beobachtete proapoptotische Effekte von AUY922 waren zudem mediiert durch Caspasen (Massey et al. 2010).

Der Inhibitor weist mit einem IC_{50} -Wert bei 21 nM eine hohe Affinität zu HSP90 auf (Brough et al. 2008). Dieser Wert bildet die Wirkstoffkonzentration ab, bei der die Proteinfunktion zu 50 % gehemmt wird. Die ermittelte GI_{50} von AUY922, also die Konzentration, die die Tumorzellproliferation um 50 % senkt, liegt im Bereich von ca. 2-40 nM. Dieser Effekt kommt durch Zellzyklusarrest und Apoptose zustande (Eccles et al. 2008). Es kann zudem eine durchschnittliche GI_{50} von 9 nM für ein größeres Spektrum von Tumorzelllinien angenommen werden (Brough et al. 2008).

Eine Studie zur Wirksamkeit von AUY922 in Xenograftmodellen mit HCT116-Kolonkarzinomzellen zeigte, dass die Behandlung zur charakteristischen molekularen Signatur einer HSP90-Inhibition führt und demnach mit einer Erhöhung von HSP72 und der Depletion von onkogenen Klientenproteinen einhergeht (Brough et al. 2008). Zudem konnte in derselben Arbeit gezeigt werden, dass AUY922 deutlich oberhalb seiner GI_{50} in Tumorzellen akkumuliert, bei einer intraperitonealen Applikation einer Konzentration von 50 mg/kg eine Halbwertszeit von 9,5 h aufweist und damit in diesen Zellen zu einer signifikanten Reduktion des Tumorwachstums führt.

Daten aus In-vitro-Versuchen mit verschiedenen Zelllinien und In-vivo-Versuchen mit Xenograft-Modellen liefern zudem Belege dafür, dass AUY922 das Potential hat, normalerweise nicht strahlensensible Neoplasien für eine Radiotherapie zu sensibilisieren (Zaidi et al. 2012). Das dabei zugrunde liegende Wirkprinzip könnte in der verzögerten homologen Rekombination vorhandener Doppelstrangbrüche mit verstärktem Anfall von pH2AX durch Beeinträchtigung der Funktion von RAD51 sowie der verstärkten Wirkung proapoptotischer Faktoren wie Caspase 3 bei abgeschwächter Wirkung von Faktoren mit Überlebenssignalen wie Akt, ErbB2 und Raf-1 liegen (Stingl et al. 2012, Zaidi et al. 2012).

Unter den klinisch untersuchten HSP90-Inhibitoren wiesen die beiden Substanzen STA-9090 (Ganetespib) und AUY922 (auch NVP-AUY922, VER-52296 oder Luminespib genannt) den bisher besten Progress innerhalb klinischer Studien auf (Whitesell und Lin 2012). AUY922 befindet sich auch weiterhin in einer Vielzahl klinischer Studien unter anderem bei Patienten mit nicht-kleinzelligem Bronchialkarzinom, gastrointestinalen Stromatumoren, Lymphomen und weiteren soliden und hämatologischen Neoplasien und konnte beispielsweise in einer Phase II-Studie als Monotherapie bei Patienten mit fortgeschrittenem nicht-kleinzelligem Bronchialkarzinom eine partielle Remission in 13 % der Fälle erreichen (Tatokoro et al. 2015).

Die in pharmakologischen Studien belegten Nebenwirkungen des HSP90-Inhibitors AUY922 beinhalten unter anderem Übelkeit, Erbrechen, Durchfall, Müdigkeit sowie eine zumeist milde und reversible Beeinträchtigung des Sehvermögens (Whitesell und Lin 2012, Sessa et al. 2013).

Der potentielle Nutzen von AUY922 bei Patienten mit Ewing-Sarkom wurde im Gegensatz zu anderen Neoplasien anhand mangelnder Publikationen zu dieser Problemstellung bisher weder in vitro noch in vivo weiterführend untersucht. 2017 wurde nach einem In-vitro-Screening neuer Substanzen jedoch erstmalig der Vorschlag geäußert, AUY922 als möglichen neuen Therapieansatz für das Ewing-Sarkom zu verfolgen (Pessetto et al. 2017).

2.7. ATM-Kinaseinhibitor KU-55933

Zur Inhibition der Kinase ATM wurde KU-55933 als spezifischer ATP-kompetitiver Antagonist der Kinaseaktivität mit einer K_i (Konzentration, bei der die Hälfte der Enzymaktivität inhibiert wird) von 2.2 nmol/L genutzt. KU-55933 beeinträchtigt die zellulären DNA-Reparaturmechanismen und führt über eine Reduktion der Aktivität von ATM zur Hypophosphorylierung der Elemente im ATM-Signalweg wie p53 oder γ -H2AX und damit zu einer Sensibilisierung maligner Zellen für ionisierende Strahlung und Doppelstrangbrüche-induzierende Zytostatika wie Etoposid (Hickson et al. 2004).

2.8. ATR-Kinaseinhibitor VE-821

Der Inhibitor VE-821 geht einen ATP-kompetitiven Antagonismus mit einer K_i von 13 nM an der Kinase ATR ein und gehört damit zur ersten Serie wirklich potenter und äußerst spezifischer ATR-Inhibitoren. Es konnte gezeigt werden, dass sich die inhibitorische Aktivität an anderen Kinasen wie ATM, DNA-dependent protein kinase (DNA-PK), mTOR und Phosphoinositol 3-Kinase- γ als minimal darstellt, der Inhibitor hingegen ATR-abhängige Phosphorylierungen wie jene von CHK1 nach DNA-Schädigung reduziert (Reaper et al. 2011).

In-vitro-Versuche zeigten, dass VE-821 Krebszellen für ionisierende Strahlung und Zytostatika wie Etoposid sensibilisieren kann und auch als einzelne Substanz eine hohe Rate an Zelltod in malignen Zellen auslösen kann, in normalen Zellen jedoch lediglich eine reversible Wachstumsinhibierung und minimale Toxizität bewirkt. Beobachtete synergistische Effekte von VE-821 und Zytostatika in Krebszellen stellten sich dabei als wesentlich potenter dar, wenn die untersuchten Zellen eine Depletion von ATM oder p53 aufwiesen.

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass maligne Zellen nach Verlust des ATM-Signalweges im Sinne des Prinzips der synthetischen Letalität verstärkt auf ATR zur suffizienten DNA-Reparatur angewiesen sind und eine Inhibierung dieser Kinase fatale Folgen bei gleichzeitiger Induktion von DNA-Schäden hat (Reaper et al. 2011, Weber und Ryan 2015).

2.9. Topoisomerasen und Etoposid

DNA-Topoisomerasen sind Enzyme, die durch transiente Unterbrechung und Wiederherstellung der Kontinuität der DNA-Doppelhelix ihrer Verstrickung trotz vielfältiger Proteininteraktionen, Verwindungen und Organisation zu Strukturen höherer Ordnung entgegenwirken.

Während die Topoisomerase I Einzelstrangbrüche einfügt, entstehen durch die Aktivität der Topoisomerase II DSBs (Montecucco et al. 2015). Das Toxin Etoposid stellt ein Derivat des aus dem Amerikanischen Maiapfel stammenden Podophyllotoxins dar. Es wurde 1966 erstmals synthetisiert und ist seit 1983 durch die FDA für die Chemotherapie von Tumoren zugelassen (Hande 1998). Indem es die Funktion der Topoisomerase II hemmt, induziert es Doppelstrangbrüche in der DNA und führt damit zu weiteren zellulären Reaktionen (Montecucco et al. 2015). Etoposid ist neben einigen anderen Wirkstoffen fester Bestandteil in der Therapie des Ewing-Sarkoms (Ozaki 2015).

3. Ziele der Arbeit

Das Ewing-Sarkom ist als zweithäufigster Knochentumor im Kindes- und Jugendalter mit einer häufigen Metastasierung und einer schlechten Prognose assoziiert.

Dabei nehmen bestimmte Mutationen wie die von p53 durch eine zusätzliche Verschlechterung der Prognose des Tumorleidens einen bestimmten Stellenwert ein (Neilsen et al. 2011). Das Chaperon HSP90 dient sowohl der Proteinhomeostase unter wechselnden zellulären Bedingungen als auch der Aufrechterhaltung von multiplen Wegen der Signaltransduktion. Es stellt damit eine Zielstruktur zur pharmakologischen Therapie insbesondere von Tumorzellen dar, da ebendiese einem anspruchsvollen zellulären Milieu ausgesetzt sind und sich zur Proliferation an Onkogenen bedienen, deren mutationsbedingte Instabilität durch HSP90 kompensiert wird (Barrott und Haystead 2013). Vorangegangene Arbeiten konnten bereits durch In-vitro- und In-vivo-Versuche einen Einblick in die herausragenden antitumorösen Effekte von AUY922 in einem breiten Spektrum von Tumorzellen geben (Eccles et al. 2008, Brough et al. 2008). Klinische Studien zur Anwendung von AUY922 zeigten zudem therapeutisches Potential in einer Vielzahl von Tumoren (Tatokoro et al. 2015).

Die hier vorliegende Arbeit soll nun die antitumorösen Effekte des HSP90-Inhibitors AUY922 auch in Ewing-Sarkomzellen zeigen. Darüber hinaus soll nach synergistischen Effekten mit Kinaseinhibitoren des DNA-Schadensantwort-Systems gesucht und zugrundeliegende Mechanismen aufgedeckt werden, um neue Therapiestrategien zur Behandlung des Ewing-Sarkoms zur erschließen.

4. Material und Methoden

4.1. Materialien

Die verwendeten Materialien und Chemikalien wurden über die Universitätsapothek Jena oder direkt bei den aufgeführten Herstellern bezogen.

4.1.1. Geräte und Arbeitsmittel

Accu-jet® Pipette Controller	BrandTech® Scientific Wertheim
BBD 6220 CO ₂ -Inkubator	Heraeus Thermo Scientific, Hanau
BD FACSCanto™ II Durchflusszytometer	BD Biosciences
BD Falcon™ Rundbodenröhrchen, 5 ml	BD Biosciences
Eppendorf BioPhotometer®/ Spektralphotometer	Eppendorf, Hamburg
CellstarR Kulturflaschen 75/25 cm ²	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
CellstarR Serologische Pipette, 1/2/5/10 ml	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
CellstarR Tubes, 15/50 ml	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
CellstarR Serologische Pipette, 1/2/5/10/25 ml	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
CellstarR Zellkulturplatten, 12/96 Well	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Combitips Plus 1,0/2,5/5,0/10,0/25,0 ml	Eppendorf, Hamburg
Eisbereiter SPR 80	NordCap GmbH & Co. KG, Bremen
Filterpipettenspitzen Clearline® low binding filter tips 1-20 µl/ 100 µl/ 1000 µl	Biosigma, Venedig/ Italien
Kühlschrank, Gefrierschrank Zellkulturlabor	Robert Bosch GmbH München
Kühlschrank, Gefrierschrank FACS-Labor	Liebherr-International Deutschland GmbH
MeliseptolR HBV Desinfektionstücher	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Mikroskop Leica	Carl Zeiss Jena GmbH, Jena
Mikrozentrifuge	Laboratory & Medical Supplies
Multipette® plus	Eppendorf, Hamburg
Neubauer Zählkammer (Improved)	Assistent Germany, Bad Blankenburg
Nitrilhandschuhe	Rösner-Mautby Meditrade
PCR Workstation	VWR international, Wien
PCR-Gerät 7900 HT fast real-time PCR system	Applied biosystems, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Pipetten Eppendorf Reference variabel 0,5-10/10-100/1000 µl	Eppendorf, Hamburg
Pipettenspitzen 10/100/1000 µl	Eppendorf, Hamburg
Plattenzentrifuge	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
PS-Röhrchen, 2 ml	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen

RNase A	Roche Deutschland GmbH
Safe Lock Tubes 0,5/1,5 ml	Eppendorf, Hamburg
Serum Pipette steril, 3 ml	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Transferpipetten, 3,5 ml	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg
Thermo scientific S2020 1.2	Thermo Electron LED GmbH
Sterilwerkbank	Langensfeld
Ultraschall Reiniger 20 HC	EMAG AG Deutschland
Ultratiefkühlschrank -86°C Forma 900	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Vortex-Genie® 2	Scientific Industries, Inc., New York
Wasserbad	Julabo GmbH, Seelbach
Zellzähler Counter AC-15	Karl Hecht AG
Mikrozentrifuge Centrifuge 5415 R	Eppendorf, Hamburg
Mikrozentrifuge Centrifuge 5417R	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge Rotanta/TR	Hettich AG, Bach, Schweiz

4.1.2. Allgemeine Reagenzien

Ampuwa® 10 ml	Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg
AUY922, Stammlösung 100 mM	Selleckchem Deutschland, freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. rer. nat. Christian Marx, FLI Jena
BD™Cytometer Setup & Tracking Beads	BD Bioscience
BioWhittakerR Trypsin EDTA 10x	Lonza, Vieviers, Belgien
Descosept AF, Desinfektionsmittel	Dr. Schumacher GmbH
DMSO	Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe
DiOC ₆ (3) (3'3-Dihexyloxycarbocyaniniodid), Endkonzentration: 50 nM	Molecular Probes
Ethanol, >99,8%ige Reinheit	Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe
Etoposid, Stammlösung 50 mM	Klinikapotheke des Universitätsklinikums der Friedrich-Schiller-Universität Jena
Glucose, wasserfrei	Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe
KU-55933, Stammlösung 10 mM	Tocris Bioscience, Bristol, Großbritannien
Propidiumiodid, Stammlosung: 1 mg/ml	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Triton® X-100	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Trypanblau 0,5 % (w/v) in PBS	Biochrom AG, Berlin
VE821, Stammlösung 20 mM	Selleckchem Deutschland, freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. rer. nat. Christian Marx, FLI Jena

4.1.3. Reagenzien für die Zellkultur

BioWhittakerR DMEM	Lonza, Vieviers, Belgien
BioWhittakerR Dulbecco's PBS ohne Ca ²⁺ und Mg ²⁺	Lonza, Vieviers, Belgien
BioWhittakerR PEN-STREP 10.000 U/ml Penicillin, 10.000 U/ml Streptomycin	Lonza, Vieviers, Belgien
BioWhittakerR RPMI-1640 mit stabilem Glutamin	Lonza, Vieviers, Belgien
BioWhittaker® Trypsin EDTA 1x	Lonza, Vieviers, Belgien
Fetales Kälberserum (FKS)	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich

4.1.4. Reagenzien RIPA-Puffer

Natriumchlorid	Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe
Natriumdeoxycholat	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Phosphataseinhibitor Phosstop	Roche Diagnostics GmbH Deutschland
Proteaseinhibitor complete ultra tablets	Roche Diagnostics GmbH Deutschland
SDS ultra pure	Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe
TRIS Ultra	Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe
Triton® X-100	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

4.1.5. Reagenzien Western Blots

Die Reagenzien für die Anfertigung der Western Blots wurden freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. rer. nat. Christian Marx, FLI Jena.

Thermo Scientific™ Pierce™ BCA™ Protein Assay	Thermo Fisher Scientific
Gelelektrophoresekammer	Bio-Rad
PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder	Thermo Fisher Scientific
Pierce™ ECL Western Blotting Substrate	Thermo Fisher Scientific
Western Bright Sirius HRP substrate	Advansta

Antikörper	Herkunft	Verdünnung	Quelle
pATR	Cell Signaling	(1:1000)	Kaninchen
ATR	Abcam	(1:1000)	Kaninchen
pCHK1	Cell Signaling	(1:1000)	Kaninchen
CHK1	Cell Signaling	(1:1000)	Kaninchen
PARP1/cl. PARP1	Cell Signaling	(1:2500)	Kaninchen
pH2AX	Merck Millipore	(1:5000)	Maus
pATM	Cell Signaling	(1:1000)	Maus
ATM	Novus Biologicals	(1:1000)	Maus
HSP90	Abcam	(1:1000)	Maus
pP53	Cell Signaling	(1:2500)	Kaninchen
P53	Santa Cruz Biotechnology	(1:5000)	Maus
cl. Caspase 3	Cell Signaling	(1:1000)	Kaninchen
BRCA1	Santa Cruz Biotechnology	(1:250)	Maus
MDM2	Santa Cruz Biotechnology	(1:5000)	Maus
CHK2	Cell Signaling	(1:1000)	Kaninchen
EWSR1	Abcam	(1:5000)	Kaninchen
FLI1	Abcam	(1:2500)	Kaninchen
Actin	Sigma Aldrich	(1:10000)	Maus
Vinculin	Santa Cruz Biotechnology	(1:5000)	Maus

4.1.6. Reagenzien und Materialien PCR

DNase I Digest Kit	VWR Life Science Competence Center, Erlangen
Omniscript RT Kit mit dNTP-Mix, RT-Puffer, Omniscript-RT und RNase-freiem Wasser	QIAGEN GmbH, Hilden
Optische 96-Well Reaktionsplatte	Applied biosystems, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
MicroAmp, optische Klebefolie	Applied biosystems, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Random Hexamers	QIAGEN GmbH, Hilden
RNaseOUT, Ribonukleaseinhibitor	Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
TaqMan™ Universal PCR Master Mix	Applied biosystems, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Total RNA Kit Mit Lysepuffer, Waschpuffer, Säulen	VWR Life Science Competence Center, Erlangen

TaqMan Genexpressionsteste:

Gen	Sondenbezeichnung
AIFM1	Hs00377585_m1
HIF1A	Hs00153153_m1
EWSR1-FLI1	Hs03024497_ft
MCL1	Hs01050896_m1
TP53	Hs01034249_m1
MDM2	Hs00242813_m1
BCL2L1 (BCL-xL)	Hs00236329_m1
BCL2	Hs00608023_m1
BCL2L11 (BIM)	Hs00708019_s1
PMAIP1 (NOXA)	Hs00560402_m1
BBC3 (PUMA)	Hs00248075_m1
CDKN1A (p21)	Hs00355782_m1
BAK1	Hs00832876_m1
BAX	Hs00180269_m1

Alle Sonden wurden von ThermoFisher Scientific bezogen.

4.1.7. Zelllinien

Die Zelllinie A673 wurde von der DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig) erworben. Die zweite Linie vom Typ WE-68 wurde freundlicherweise von Dr. F. van Valen (Münster, Deutschland) bereitgestellt.

A673:

Zellen eines Ewing-Sarkoms, die aus Muskelgewebe einer 15-jährigen Patientin etabliert worden sind. Charakteristika sind epitheliales und adhärentes Wachstum sowie ein p53-Null Status. Die Zellen benötigen zum Wachstum ein Medium aus 500 ml DMEM mit 4,5 g/l Glucose und den Zusätzen aus 50 ml FKS und 5 ml Penicillin/Streptomycin sowie einen kollagenbeschichteten Boden.

WE-68:

Ewing-Sarkomzellen einer weiblichen Patientin. Es handelt sich ebenfalls um adhärente Zellen. Die Zelllinie weist einen p53-Wildtyp auf. Sie wird in kollagenbeschichteten Flaschen kultiviert und benötigt ein RPMI-1640 Medium mit Ultraglutamin und den Zusätzen aus 50 ml FKS und 5 ml Penicillin/Streptomycin.

4.2. Methoden

4.2.1. Zellkultivierung

4.2.1.1. Anlegen einer Zellkultur

Zunächst wurden die bei -196 °C eingefrorenen Zelllinien unter Schütteln im Wasserbad zügig aufgetaut. Die aufgetauten Zellen wurden anschließend in 15 ml Medium überführt und bei 1200 U/min 3 min zentrifugiert. Der entstandene Überstand wurde dekantiert und das Zellpellet im vorgewärmten Medium resuspendiert. Dabei wurden die Zellen der Linie A673 in 5 ml suspendiert und in eine 25 cm² Kulturflasche ausgesät, wohingegen die Linie WE-68 aufgrund der sehr raschen Proliferation sofort mit 15 ml Medium in eine 75 cm² Kulturflasche pipettiert wurde. Das Auftauen der Zelllinien wurde freundlicherweise von der medizintechnischen Assistentin Sabine Becker übernommen.

Vorbereitend zur Anlage der Zellkulturen mussten zudem die Böden der jeweiligen Kulturflaschen und Well-Platten mit Kollagen beschichtet werden. Um die Kulturflaschen und Well-Platten mit Kollagen beschichten zu können, wurden 10 mg Kollagen zunächst in 500 ml steriler, 0,1%iger Essigsäure gelöst. Zur Herstellung der 0,1%igen Essigsäure wurden 500 µl 100 % Essigsäure in 500 ml sterilem, destilliertem Wasser pipettiert. Der Ansatz aus Kollagen und Essigsäure wurde anschließend über mindestens 24 h stehen gelassen.

Zur Beschichtung der Flaschen und Wells wurden in diese 18 ml der Lösung pro 75 cm² Flasche und 6 ml pro 25 cm² Flasche bzw. 1 ml Lösung pro Well für 12-Wellplatten und 2 ml Lösung pro Well für 6-Wellplatten pipettiert und die Behältnisse für mindestens 12 h zum Absetzen des Kollagens erschütterungsfrei und steril gelagert. Schließlich wurde mithilfe einer Absaugeinheit die Kollagenlösung aus den Flaschen und Well-Platten abgezogen. Nach Lufttrocknung der Flaschen und Platten in der sterilen Werkbank wurden diese steril verpackt und gelagert.

4.2.1.2. Passagieren der Zellen

Im Turnus von drei bis vier Tagen wurden die Zellen nach Erreichen einer Konfluenz von ca. 90 % in eine neue Flasche überführt.

Zunächst wurde dabei das alte Medium abpipettiert und verworfen und die Zellen zwei Mal mit 10 ml DPBS gespült, welches danach ebenfalls verworfen wurde.

Weiterhin wurden die Zellen danach mit 2,5 ml Trypsin für 7 min inkubiert, um die adhärenen Zellen vom Flaschenboden zu lösen. Dieser Prozess wurde durch leichtes Klopfen an den Flaschenseiten unterstützt. Die Kulturflaschen wurden danach zuerst mit 6 ml Medium und ein zweites Mal mit 10 ml Medium gespült, dieses Medium wurde zusammen mit den trypsinisierten Zellen dann in ein 50 ml Röhrchen überführt und 3 bis 5 min bei 1200 U/min zentrifugiert.

Nach dem Dekantieren des Überstandes wurden die Zellen erneut in 10 ml Medium suspendiert.

4.2.1.3. Bestimmung der Zellzahl

Aus den resuspendierten Zellen wurden zur Zellzahlbestimmung 20 µl mit ebenfalls 20 µl Trypanblau gemischt und anschließend in eine mit einem Deckglas abgedeckte Neubauer-Zählkammer pipettiert.

Die Gesamtzellzahl wurde durch Abzählen der sich in zwei diagonal gegenüberliegenden großen Quadranten befindlichen Zellen unter dem Mikroskop ermittelt. Dabei wurde zwischen vitalen, ungefärbten und toten, mit Trypanblau gefärbten Zellen unterschieden. Die prozentuale Vitalität ermittelt sich über die Anzahl lebendiger Zellen durch die Gesamtzellzahl multipliziert mit dem Faktor 100. Dabei wurde zur Beibehaltung einer hohen Qualität der Zellkultur auf die Einhaltung einer Vitalität über 90 % geachtet.

4.2.1.4. Weiterführen der Kultur

Um die Zellen in optimalen Bedingungen weiterzukultivieren, wurde nach der Passage eine von der Art der Zellkultur abhängige Anzahl an Zellen zusammen mit dem entsprechenden Medium in eine neue 75 cm² Flasche bis zum Erreichen eines Maximalvolumens von 20 ml gegeben. Es wurden dabei Flaschen mit kollagenbeschichtetem Boden verwendet. Die Anzahl der Zellen ergab sich aus der Zellteilungsrate und dem angestrebten Zyklus bis zur nächsten Verwendung der Zelllinie. Für die Zelllinie A673 wurden für den kürzeren 3-Tages Zyklus $1,3 \times 10^6$ und für den längeren 4-Tages Zyklus $1,1 \times 10^6$ Zellen angesetzt.

Für die Zelllinie WE-68 wurden analog dazu für 3 Tage $3,5 \times 10^6$ und für 4 Tage $2,5 \times 10^6$ Zellen in die neue Flasche gegeben.

Die Kulturflaschen wurden für den veranschlagten Zeitraum dann im Kulturschrank bei 37 °C und einer Luftfeuchtigkeit von 95% inkubiert.

4.2.2. Durchflusszytometrische Analysen

4.2.2.1. Prinzip der Durchflusszytometrie

Die Ermittlung der Wirksamkeit der auf die Zellen applizierten Hemmstoffe wurde mittels Durchflusszytometrie oder umgangssprachlich FACS-Analyse durchgeführt. Das Prinzip der Durchflusszytometrie beruht auf einer Vereinzelung der zu vermessenden Zellen mittels sogenannter hydrodynamischer Fokussierung.

Das heißt, dass die Zellen vereinzelt hintereinander (perlenschnurartig) an einem Laser vorbeigeführt werden, sodass über das entstehende Streulicht am Photodetektor Informationen über jede Zelle gewonnen werden können. Das Vorwärtsstreulicht (engl. *forward scatter*, FSC) dient dabei als Maß für das Volumen und damit die Größe der Zelle, während das Seitwärtsstreulicht (engl. *sideward scatter*, SSC) Aussagen über die Granularität, die Menge an Vesikeln und die Struktur des Zellkerns und insgesamt damit über die Komplexität der Zelle möglich macht.

4.2.2.2. Zelltod und mitochondriales Membranpotential

Neben der Messung des Streulichtes ermöglicht darüber hinaus die Lichtemission von in Zellen befindlichen Fluoreszenzfarbstoffen weitere Untersuchungen. Um den durch die Wirkstoffe verursachten Zelltod zu ermitteln, wurde Propidiumiodid (PI) verwendet, das in tote Zellen mit geschädigter Membran eindringt und anschließend in die DNA interkaliert.

Im DNA-gebundenen Zustand weist Propidiumiodid ein Absorptionsmaximum bei 535 nm und ein Emissionsmaximum bei 617 nm auf. Um den Verlust des mitochondrialen Membranpotentials ($\Delta\psi_m$) zu messen, wurde DiOC₆(3) (3'3'-Dihexyloxacarbocyaniniodid) verwendet. Dieser grün fluoreszierende Farbstoff ist lipophil und lagert sich aufgrund seiner positiven Ladung selektiv in die negativ geladene Membran der Mitochondrien lebendiger Zellen ein und weist dort ein Absorptionsmaximum bei 484 nm und ein Emissionsmaximum bei 501 nm auf.

Verlieren diese Mitochondrienmembranen im Rahmen der Prozesse, die zum Zelltodes führen, ihre Integrität, geht zusammen mit der Ladung auch das im Inneren akkumulierte DiOC₆(3) wieder verloren. Dementsprechend kann der Anteil der apoptotischen und damit ungefärbten Zellen an der Gesamtheit ermittelt werden.

4.2.2.3. Anlegen der Wells und Behandlung der Zellen

72 h vor Durchführung der Durchflusszytometrie wurden die Zellen ausgesät. Dazu wurden 6-Well-Platten mit 100.000 Zellen pro Well für die Linie A673 und 12-Well-Platten mit 150.000 Zellen je Well für die kleineren Zellen der Zelllinie WE-68 angelegt. Zum Aussäen der Zellen in die kollagenbeschichteten Wells wurden neue Zellsuspensionen mit den entsprechenden Medien in einem 50 ml Röhrchen erstellt. Dabei betrug die Anzahl der Zellen pro ml für die Zelllinie A673 100.000 und für die Linie WE-68 – bedingt durch die kleinere Zellgröße – 150.000. Per Multipette wurde zunächst in die 6-Well-Platten der A673 1 ml Medium vorgelegt und schließlich 1 ml der Zellsuspension in jedes Well gegeben. Auf die 12-Well-Platten wurde direkt 1 ml Zellsuspension je Well pipettiert. Anschließend wurden die Kulturplatten im Brutschrank bei 37 °C und 95 % Luftfeuchtigkeit inkubiert. Nach 24 h wurden die mittlerweile am Boden der Wells festgewachsenen Zellen mit den Wirkstoffen AUY922, VE-821, KU-55933 oder Etoposid behandelt. Die dafür verwendeten Konzentrationen wurden in Vorversuchen ermittelt. Zellen beider Zelllinien wurden in einer ersten Versuchsreihe vor Behandlung mit AUY922 1 h lang mit zwei verschiedenen Konzentrationen der Kinaseinhibitoren VE-821 und KU-55933 vorinkubiert.

Inhibitor	Konzentrationen A673	Konzentrationen WE-68
AUY922	15 / 20 / 25 / 30 / 35 nM	30 / 35 / 40 / 45 / 50 nM
VE-821	5 / 10 µM	2 / 3 µM
KU-55933	5 / 10 µM	7,5 / 10 µM

Tab. 1: Konzentrationen für die Vorbehandlung mit VE-821 und KU-55933 und die Behandlung mit AUY922

Die optimalen Konzentrationen der zu verwendenden Substanzen wurden in Vorversuchen anhand der Toxizität über insgesamt 48 h ermittelt.

In einer weiteren Versuchsreihe wurden die Zellen mit den Inhibitoren AUY922, VE-821 oder KU-55933 wiederum 1 h vorinkubiert und anschließend mit Etoposid über 48 h weiterbehandelt.

Inhibitor	Konzentrationen A673	Konzentrationen WE-68
Etoposid	0,5 / 1 / 1,5 μ M	0,1 / 0,2 / 0,3 μ M
AUY922	10 / 15 nM	30 / 40 nM
VE-821	1 / 5 μ M	1 / 2 μ M
KU-55933	5 / 10 μ M	7,5 / 10 μ M

Tab. 2: Konzentrationen für die Vorbehandlung mit AUY922, VE-821 und KU-55933 und die Behandlung mit dem Zytostatikum Etoposid

Die optimalen Konzentrationen der zu verwendenden Substanzen wurden in Vorversuchen anhand der Toxizität über insgesamt 48 h ermittelt.

Um die gewünschten Konzentrationen zu erhalten, wurden zuerst Verdünnungsreihen durchgeführt. Dies war für AUY922, VE-821 und Etoposid mit Medium möglich und wurde bei KU-55933 mit DMSO durchgeführt. Auf die Wells der 6-Well-Platte wurden anschließend 20 μ l der Verdünnungen von AUY922 oder Etoposid und VE-821 bzw. 4 μ l der Verdünnung von KU-55933 gegeben. In die Wells der 12-Well-Platten wurden 10 μ l der Verdünnungen von AUY922 oder Etoposid und VE-821 bzw. 2 μ l der Verdünnung von KU-55933 pipettiert. Die Nullprobe wurde mit einem korrespondierenden Volumen an DMSO behandelt.

Die Verdünnungsreihen und die Behandlung der Zellen fanden unter sterilen sowie lichtgeschützten Kautelen statt. Nach Verstreichen weiterer 48 h konnten die durchflusszytometrischen Tests durchgeführt werden.

4.2.2.4. Messung der Kompensation

Zwischen den Fluoreszenzspektren der beiden Stoffe PI und DiOC₆(3) können Überschneidungen auftreten, welche dann zu falsch positiven Ergebnissen führen. Deshalb müssen diese Streuungen in das jeweils andere Spektrum gemessen und anschließend abgezogen werden, diese Korrektur der Überlappung wird als Kompensation bezeichnet.

Um diese festlegen zu können, müssen neben den angelegten Wells für die Experimente drei weitere Wells mit ebenfalls 100.000 Zellen für die Zelllinie A673 und 150.000 Zellen für die Zelllinie WE-68 ausgesät werden. Diese Wells wurden dann über 72 h im Kulturschrank belassen. Vor der Messung wurde in eines der drei Wells 1 µl DiOC₆(3) pro ml Medium gegeben und für weitere 45 min inkubiert. Anschließend wurden die zur Kompensation benötigten Wells zusammen mit den anderen behandelten Versuchsplatten abgeerntet. Um die Zellen in einem der beiden anderen Wells abzutöten, wurden vor der Messung 55 µl 0,5%iges Triton X-100 hinzugefügt und zur Feststellung des Zelltodes 1 µl PI hinzugegeben. Die dritte Probe wurde unbehandelt und ungefärbt belassen und diente als Negativkontrolle der Feststellung der zu untersuchenden Zellpopulation. Nach Messung der Proben und Anpassung der Gates für den FSC, den SSC und der jeweiligen Fluoreszenzintensitäten von PI und DiOC₆(3), konnte die Kompensation errechnet werden.

4.2.2.5. Probenvorbereitung und Durchführung der Durchflusszytometrie

Vor Beginn der Messung am Durchflusszytometer BD FACSCanto™ II wurde mittels der Software BD FACSDiva ein entsprechendes Experiment angelegt, die Messeigenschaften für die zu messenden Zelllinien definiert und die notwendige Kompensation eingetragen.

Zur Auswertung wurden drei Dotplots erstellt. Im ersten wurde SSC gegen FSC aufgetragen, um die gewünschte Zellpopulation identifizieren zu können. Im zweiten wurde PI gegen FSC aufgetragen und im dritten die DiOC₆(3) gegen FSC. Zusätzlich wurden zwei Histogramme hinzugefügt, in denen die Anzahl der Zellen zu PI bzw. DiOC₆(3) aufgetragen wurde. Nach der Messung wurden in die Diagramme Fenster, sogenannte Gates, eingetragen, um die zu betrachtenden einzelnen Zellen von Zelldetritus, Zellkonglomeraten und Verunreinigungen zu separieren. Die einzelnen Zellen wurden über die Population P1 im ersten Dotplot erfasst, die abgetöteten über die Population P2 im PI/FSC-Dotplot. Über Intervall-Gates konnte im DiOC₆(3)-Histogramm der Anteil der Zellen mit verloren gegangenem mitochondrialen Membranpotential bestimmt werden.

Die zur Messung des Zelltodes und des Verlustes des mitochondrialen Membranpotentials bestimmten Wells wurden 45 min vor Ernte mit je 1 μ l DiOC₆(3) pro ml Medium versehen. Darauf wurde das Medium zusammen mit den in Lösung gegangenen Zellen mittels Transferpipetten in 4 ml FACS-Röhrchen überführt und die Wells erneut mit 1 ml DPBS gespült. Auf die 12-Well-Platten wurden weiterhin 250 μ l 1:10 in DPBS verdünntes Trypsin gegeben, während die 6-Well-Platten mit 500 μ l dieser Verdünnung behandelt wurden. Nach einer siebenminütigen Inkubationszeit im Kulturschrank wurden die Wells zwei Mal mit je 500 μ l DPBS gespült, die gelösten Zellen vereinzelt und erneut mittels Transferpipetten in die FACS-Röhrchen überführt. Nach einer kurzen mikroskopischen Kontrolle der Wells zur Feststellung einer vollständigen Ernte wurden die Röhrchen verschlossen, über Kopf geschwenkt und bei 1800 U/min für 5 min bei 20 °C zentrifugiert. Die weitere Behandlung der Proben fand nach der Zentrifugation in einer mit Eis gefüllten Wanne statt. Der entstandenen Überstand wurde dekantiert, das Zellpellet in 500 μ l DPBS resuspendiert und mittels Pipette vereinzelt. Vor Messung der Experimente wurde in jedes Röhrchen 1 μ l PI gegeben, gevortext und für mindestens 20 sec inkubiert. Zuletzt wurden die Röhrchen in das Durchflusszytometer eingesetzt, der Messvorgang per Programm gestartet und die Ergebnisse wurden dokumentiert.

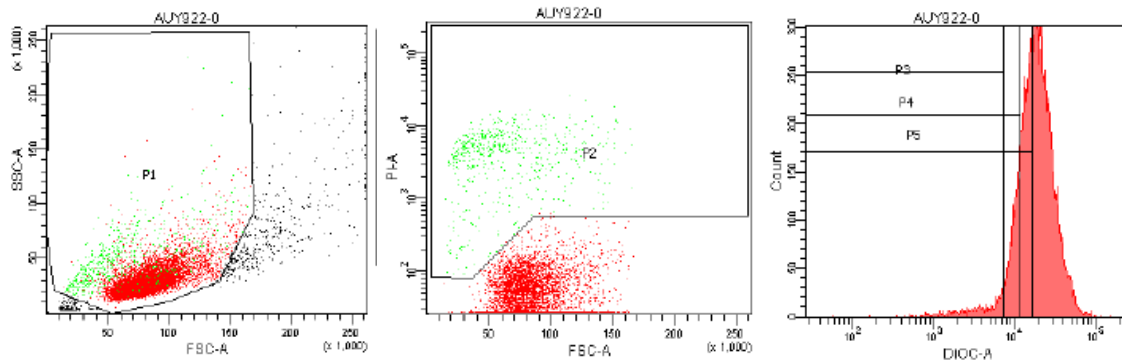


Abb. 1: Dotplots und Histogramme zur Auswertung der FACS-Analysen beispielhaft für eine Nullprobe der Zelllinie A673

Das Gate P1 zeigt die zu untersuchenden Zielzellen, die durch das Raster von entstandenem Zelldetritus und nicht vereinzelbaren Dubletten abgegrenzt wurden. P2 zeigt im zweiten Diagramm den Anteil der Zellen mit PI-Aufnahme und damit tote Zellen. Im rechten Diagramm separiert P3 den Anteil der Zellen von P1 mit verlorenem mitochondrialem Membranpotential links von der Masse der Zellen mit intaktem mitochondrialem Membranpotential rechts, also lebendigen Zellen.

4.2.2.6. Kombinationsindexanalyse

Die Auswertung der durchflusszytometrischen Messungen wurde mittels der Kombinationsindexanalyse durchgeführt. Um einen möglicherweise vorhandenen Synergismus zweier Substanzen im Hinblick auf den Zelltod zu ermitteln, reicht es nicht aus, die Effektivität beider Stoffe separat zu betrachten, diese Effekte zu summieren oder ein arithmetisches Mittel zu bilden. Auch statistische Effekte, die sich in Form eines p-Wertes als signifikant oder nicht signifikant qualifizieren, tragen nicht zur Aussage über synergistische Effekte bei. Eine Grundlage zur mathematischen Annäherung an dieses Problem wurde 1976 zunächst durch die Medianeffekt-Gleichung von Chou zur Analyse von Dosis und Wirkung geschaffen.

Diese Gleichung vereint die vier großen biomedizinisch bedeutsamen Gleichungen nach Henderson-Hasselbach, Michaelis-Menten, Hill und Scatchard, birgt die Voraussetzung zur Beschreibung einzelner Dosiseffekte und mündet in die Theorie des Kombinationsindex (Chou 2006).

Die generelle Medianeffekt-Gleichung nach Chou lautet:

$$f_a/f_u = (D/D_m)^m$$

Dabei stellt f_a den Anteil der durch den Inhibitor beeinflussten Enzyme dar, f_u den unbeeinflussten Anteil dieser Enzyme. D steht für die Dosis bzw. Konzentration eines Medikamentes, D_m für die Mitteleffekt-Dosis (z. B. IC50, ED50, oder LD50) und m für einen Koeffizienten, der die Form der Dosis-Wirkungs-Kurve wiedergibt. Dabei gibt $m=1$, >1 und <1 einen hyperbolischen, sigmoidalen oder flachsigmoidalen Verlauf an (Chou 2006, Chou 2010).

Diese Formel zur Beschreibung einer Dosis-Wirkungs-Beziehung kann bei gleichzeitiger Anwendung mehrerer Substanzen bzw. Inhibitoren erweitert werden und lautet dann:

$$(f_a)_{1,2}/(f_u)_{1,2} = (f_a)_1/(f_u)_1 + (f_a)_2/(f_u)_2 = D_1/(D_m)_1 + D_2/(D_m)_2$$

Bzw. alternativ, wenn $m \neq 1$:

$$[(f_a)_{1,2}/(f_u)_{1,2}]^{1/m} = [(f_a)_1/(f_u)_1]^{1/m} + [(f_a)_2/(f_u)_2]^{1/m} = D_1/(D_m)_1 + D_2/(D_m)_2$$

Auf der Basis dieser Gleichungen formulierten Chou und Talalay 1983 den Begriff des Kombinationsindex zur Quantifizierung von synergistischen, additiven und antagonistischen Effekten. Die so entstandene Gleichung lautet wie folgt:

$$CI = D_1/(D_x)_1 + D_2/(D_x)_2 = D_1/(D_m)_1 [f_a/(1-f_a)]^{1/m_1} + D_2/(D_m)_2 f_a/(1-f_a)^{1/m_2}$$

$(D_x)_1$ ist für D_1 die Dosis, die x% des Systems hemmt und $(D_x)_2$ ist analog dafür die von D_2 . $(D_x)_1$ und $(D_x)_2$ ergeben sich aus der allgemeinen Medianeffekt-Gleichung (Chou 2006).

Die dabei errechneten CI-Werte lassen anschließend eine Zuordnung der Wirkstoffkombinationen zu synergistischen Effekten ($CI < 1$), additiven Effekten ($CI = 1$) oder antagonistischen Effekten ($CI > 1$) zu (Chou 2006, Chou 2010). Zur Anwendung kommen die Formeln innerhalb eines Algorithmus zur automatischen Berechnung am Computer. Die Methode nach Chou-Talalay wurde dabei durch das Programm CompuSyn von Biosoft angewandt.

4.2.3. Western Blot

4.2.3.1. Herstellung der Lysate für Western Blots

Um die intrazellulären Veränderungen im Proteinhaushalt als Antwort auf den HSP90-Inhibitor AUY922 zu untersuchen, wurden bei beiden Zelllinien Western Blots durchgeführt. Dazu wurde je eine Million Zellen in 6 ml Medium in 25 cm²-Flaschen ausgesät. Anschließend wurden die Zellen in einer ersten Versuchsreihe mit Konzentrationen von 20 nM und 30 nM AUY922 über 24 und 48 h und in einer zweiten Versuchsreihe mit Konzentrationen von 15 nM, 30 nM und 50 nM AUY922 über 2 und 24 h zusammen mit einer Nullprobe inkubiert. Die Verdünnung von AUY922 fand dabei unter Verwendung von Zellkulturmedium statt. Nach der Inkubation wurde das Medium abpipettiert und die Flaschen mit 2 ml DPBS gespült, mit je 1 ml Trypsin für 7 min im Brutschrank inkubiert und anschließend zweifach mit je 1 ml DPBS gespült und in 15 ml-Röhrchen geerntet. Danach wurden die Röhrchen bei 4 °C über 10 min zentrifugiert und weiter auf Eis gelagert. Die entstandenen Überstände wurden dekantiert und die sich erneut am Röhrchenboden gesammelte Flüssigkeit wurde vorsichtig abpipettiert.

Anschließend wurde das Zellpellet in 100 µl RIPA-Puffer (Zusammensetzung: 150 mM Natriumchlorid (NaCl), 1 % Triton X-100, 0,5 % Natriumdesoxycholat, 0,1 % SDS (Natriumdodecylsulfat), 40 mM Tris, pH 8,0) mit Phosphatase- und Protease-Inhibitoren resuspendiert, in 1,5 ml-Röhrchen von Eppendorf überführt und zum vollständigen Abtöten und Lysieren der Zellen in einem Kühlakku für 30 min im Kühlschrank gelagert. Danach wurde jedes Röhrchen gründlich gevortext, für 5 min bei 4 °C im Ultraschallbad behandelt und schließlich bei 4 °C und 13000 U/min erneut für 10 min zentrifugiert. Der entstandene Überstand wurde in 0,5 ml-Röhrchen von Eppendorf abpipettiert und bis zum Erstellen der Western Blots bei -80 °C eingefroren, das Pellet wurde verworfen.

Vor der Gelelektrophorese wurde ein BCA-Test durchgeführt, bei dem die Lysate zusammen mit verschiedenen konzentrierten Referenzproben an Rinderserumalbumin (BSA) photometrisch gemessen wurden. Anhand einer für BSA erstellten Eichkurve wurden die Proteinkonzentrationen in den Lysaten ermittelt und mittels RIPA-Puffer auf einheitliche Konzentrationen verdünnt.

Die Proben wurden anschließend im Verhältnis 1:6 mit Lämmli-Puffer (35 % β -Mercaptoethanol, 350 mM Tris, pH 6,8, 30 % Glycerin, 10 % SDS, 0,25 % Bromphenolblau) verdünnt und für 7 min auf 95 °C erhitzt, um eine vollständige Denaturierung der Proteine und eine Anlagerung des SDS an die Proteine zu erreichen.

4.2.3.2. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page)

Die Lysate wurden anschließend anhand ihrer Größe mittels eines abgestuft konzentrierten Polyacrylamidgels aufgetrennt. Dabei wurde ein Stufengel aus 15%igen, 12%igen und 7%igen Trenngelen in vorher eingespannte und abgedichtete Glaskammern gegossen, nach jeder neuen Schicht mit 300 µl Isopropanol geglättet, je 20 min bis zur Polymerisation gewartet und nach Fertigstellung des Trenngels ein 4%iges Sammelgel bis zur vollständigen Füllung aufgetragen. Das Sammelgel wurde mittels eines Kammes mit Probentaschen versehen. Die Bestandteile der jeweiligen Gelkonzentrationen sind in den folgenden beiden Tabellen für Trenn- und Sammelgele angegeben. Die Mengenangaben dienen jeweils der Herstellung von 2 Gelen.

	7%iges Trenngel	12%iges Trenngel	15%iges Trenngel
Endvolumen	16 ml	16 ml	16 ml
ddH ₂ O	5,9 ml	3,3 ml	1,7 ml
30 % Acrylamid	3,73 ml	6,4 ml	8 ml
1 M Tris pH 8,8	6 ml	6 ml	6 ml
10 % SDS	160 µl	160 µl	160 µl
10 % APS	160 µl	160 µl	160 µl
TEMED	16 µl	16 µl	16 µl

Tab. 3: Bestandteile und deren Anteile an den verwendeten Trenngelen

	4%iges Sammelgel
Endvolumen	10 ml
ddH ₂ O	7,25 ml
30 % Acrylamid	1,33 ml
1 M Tris pH 6,8	1,25 ml
10 % SDS	100 µl
10 % APS	100 µl
TEMED	10 µl

Tab. 4: Bestandteile und deren Anteile am verwendeten Sammelgel

In die Taschen des Sammelgels wurden anschließend je 18 µl der Probe pro Tasche aufgetragen und in drei freigebliebene Taschen am Anfang, in der Mitte und am Ende des Gels 5 µl des Proteinmarkers pipettiert. Die Elektrophorese fand anschließend über 1,5 h bei konstant 130 V in einfach konzentriertem Laufpuffer statt.

4.2.3.3. Western Blot und Immunodetektion der Proteine

Nach stattgefundenener Gelelektrophorese wurden die Proteine innerhalb der SDS-Page im sogenannten Western Blot auf eine Polyvinylidenfluoridmembran übertragen. Die Membranen wurden zunächst in reinem Alkohol aktiviert und die Transferkassetten wurden mit Schwämmen und Filterpapieren bestückt. Anschließend wurden die Membranen angelagert an die SDS-Page eingelegt und wiederum mit Filterpapieren und Schwämmen abgedeckt. Die geschlossene Kasette wurde in die Transferkammer eingesetzt und letztere wurde mit SDS-Puffer mit 20 % Ethanol als Transferpuffer aufgefüllt. Über Nacht erfolgte der Transfer bei einer Stromstärke von 20 mA pro Membran.

Am darauffolgenden Tag wurden die Membranen für 1 h in einer 5%igen Magermilchpulverlösung (Blockierungslösung) bei Raumtemperatur inkubiert, um freie Proteinbindestellen auf der Membran zu blockieren. Anschließend wurden die Membranen nach den zu untersuchenden Proteinen in Streifen geschnitten und in Lösungen aus 50 % TBS-T-Puffer, 50 % der o. g. Magermilchlösung und 0,02 % Natriumazid mit Primärantikörpern gegeben und über Nacht bei 4 °C auf einem Rollmischgerät inkubiert. Die Membranen wurden hiernach drei Mal für 10 min in TBS-T gewaschen und dann für 1 h bei Raumtemperatur mit Sekundärantikörpern inkubiert. Diese mit Meerrettichperoxidase gekoppelten Antikörper wurden zuvor im beschriebenen Verdünnungsverhältnis in eine Lösung aus einem Drittel Blockierungslösung und zwei Dritteln TBS-T pipettiert. Nach weiteren drei Waschschritten zu je 10 min in TBS-T wurden die Membranen in eine Fotokassette gelegt und mit ECL-Lösung behandelt. Nach dieser Behandlung setzt die Peroxidase unter Anwesenheit von H_2O_2 Luminol zu 3-Aminophtalat um, wobei messbares Licht emittiert wird. Dieses Licht wurde dann an einem Chemilumineszenzdetektor gemessen, wodurch die entstandenen Proteinbanden und damit die Stärke der Expression dargestellt werden konnten.

4.2.4. Zellzyklusanalyse

Zur Untersuchung der Auswirkung der verwendeten Wirkstoffe auf den Zellzyklus wurden Zellzyklusanalysen durchgeführt. Dazu wurden A673-Zellen zu 100.000 und WE-68-Zellen zu 150.000 Zellen pro Well ausgesät, nach 24 h mit den unten genannten Wirkstoffkonzentrationen behandelt und für 48 h im Inkubator belassen. Die Verdünnung der Wirkstoffe wurde wie beschrieben durchgeführt (s. Kapitel 4.2.2.3.). Nach Abpipettieren der Überstände in FACS-Röhrchen wurden die Wells mit je 1 ml an vorgewärmtem DPBS gespült und mit 250 (WE-68) bzw. 500 (A673) μ l 1:10 in DPBS verdünntem Trypsin versehen. Nach circa 7 min wurden die Zellen unter leichtem Klopfen gelöst und die Wells zweimalig mit 500 μ l DPBS gespült. Die so geernteten Zellen wurden zusammen mit dem abpipettierten Medium bei 4 °C und 1800 U/min 5 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde scharf dekantiert und die Zellen in der zurücklaufenden Flüssigkeit resuspendiert.

Anschließend wurde den Zellen tropfenweise unter ständigem Vortexen zweimal 1 ml 70%iges, bei -20 °C gelagertes Ethanol hinzugegeben.

Die Zellen wurden dann mindestens über Nacht und maximal für 2 Wochen fixiert. Zur Analyse des Zellzyklus wurden die so fixierten Zellen wieder bei 4 °C und 1800 U/min 5 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde scharf abgekippt, das Zellpellet in zurücklaufender Flüssigkeit resuspendiert, weiterhin mit 500 µl tropfenweise unter ständigem Vortexen zugegebener Glucose-PI-Lösung (1 ml DPBS, 50 µl 20%ige Glucoselösung (=1%ige Glucose), 50 µl PI und 2,5 µl RNase A) behandelt und für 45 min im Kühlschrank inkubiert. Die Messung der jeweiligen Populationen im Zellzyklus erfolgte anschließend am Durchflusszytometer bei einer geringen Flussrate, einem Oberwert von 20.000 gemessenen Ereignissen pro Messung und unter linearer Bestimmung der PI-Fluoreszenz.

Inhibitor	A673	WE-68
AUY922	10 / 15 / 20 nM	30 / 35 / 40 nM
KU-55933	1 / 2 / 5 µM	1 / 2 / 3 µM
VE-821	1 / 2 / 5 µM	5 / 7,5 / 10 µM

Tab. 5: Konzentrationen der innerhalb der Experimente zur Zellzyklusanalyse verwendeten Substanzen

Die verwendeten Konzentrationen wurden anhand möglichst niedriger Toxizitäten aus Vorversuchen ausgewählt.

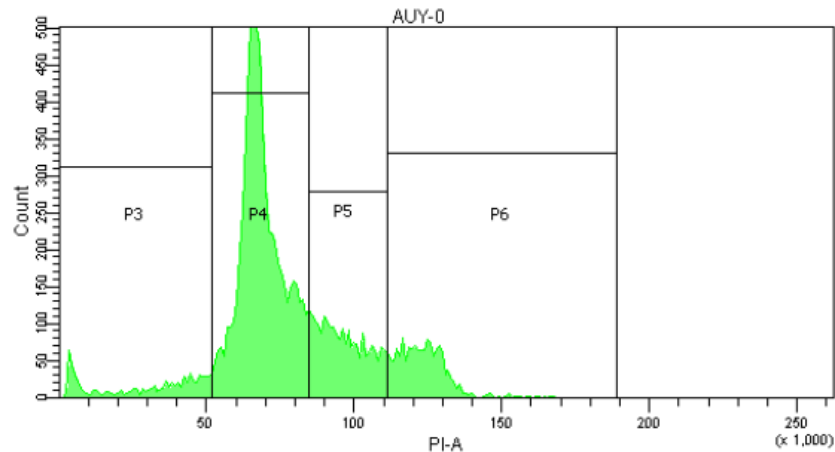


Abb. 2: Profil des Histogramms in der Zellzyklusanalyse

Die untersuchten Zellen werden abhängig von ihrem aktuellen Aufenthalt innerhalb der verschiedenen Phasen des Zellzyklus durch das Raster unterteilt. P3 stellt dabei den Anteil der Sub-G1-Zellen dar, P4 den der Zellen in der G1-Phase, P5 bildet die Zellen der S-Phase und P6 die der G2/M-Phase ab.

4.2.5. Quantitative Echtzeit-PCR

4.2.5.1. Funktionsweise

Die Messung der Expression von Zielgenen innerhalb der untersuchten Zelllinien nach Wirkstoffexposition wurde mittels quantitativer Echtzeit-PCR realisiert. Diese Methode beruht zunächst auf dem Prinzip der herkömmlichen Polymerase-Kettenreaktion, bei der über mehrere Zyklen wiederholt Doppelstrang-DNA bei 95 °C entlang der Wasserstoffbrückenbindungen aufgetrennt wird, hinzugegebene Primer und Sonden mit den Einzelsträngen bei ca. 60 °C hybridisieren und anschließend auf diesem Temperaturniveau die fehlenden Deoxyribonukleinsäuren von einer hitzestabilen DNA-Polymerase aus dem Bakterium *Thermus aquaticus* ergänzt werden. Das Prinzip der Taqman®-Signalamplifikation durch die zugeführten Sonden wird durch eine Verknüpfung der sequenzspezifischen Sonden am 3'-Ende mit einem fluoreszierenden Reporterfarbstoff (VIC™ oder FAM™-Markierung) erreicht, der von einem nicht-fluoreszierendem Quencher am 5'-Ende unterdrückt wird. Erreicht die DNA-Polymerase nach Beginn ihrer Syntheseleistung am Primer bzw. am 3'-Ende der Probe die Sonde, spaltet sie durch ihre Endonuklease-Aktivität das 3'-Ende der Sonde ab.

Das nun nicht mehr durch den Quencher überlagerte, und damit auch nicht mehr suppressierte Signal des Fluoreszenzfarbstoffes, kann dann proportional zur Vervielfältigung des Gens pro Zyklus – also in Echtzeit – gemessen werden.

4.2.5.2. RNA-Präparation

Für die quantitative Echtzeit-PCR wurden je 200.000 Zellen vom Typ WE-68 pro Well ausgesät und pro Probe jeweils zwei Wells angelegt. Im Falle der A673-Zellen wurden aufgrund deren Größe nur 150.000 Zellen pro Well ausgesät. Auch hier wurde jede Probe doppelt angelegt. Die Wells wurden nach 24 h mit den untenstehenden, möglichst wenig toxischen Konzentrationen behandelt. Die Verdünnung der Wirkstoffe fand dabei in beschriebener Weise statt (s. Kapitel 4.2.2.3.). Die Inhibitoren wurden sowohl in Einzel- als auch in Kombinationsversuchen angewandt. Innerhalb der Kombinationsversuche dienten VE-821 und KU-55933 jeweils als Vorbehandlung mit einer Vorinkubationszeit von 1 h. Nach der Behandlung bzw. Weiterbehandlung wurden die Zellen erneut für 24 h im Inkubator belassen.

Im Anschluss konnten die Überstände in 15 ml-Röhrchen pipettiert, die Wells mit je 1 ml DPBS gespült, die Zellen trypsinisiert und jedes Well erneut mit 2 mal 500 µl DPBS gespült werden. Die Röhrchen wurden dann mit DPBS aufgefüllt und bei Raumtemperatur 5 min bei 1800 U/min abzentrifugiert.

Die Überstände wurden des Weiteren verworfen und die trockenen Zellpellets auf Eis entsprechend den Anweisungen des RNA-Kit-Herstellers weiterverarbeitet. Dazu wurde jeder Probe 400 µl RNA-Lysepuffer (total RNA kit) hinzugefügt und mit einer Pipette homogenisiert. Das so entstandene Lysat wurde anschließend auf eine DNA-Removing-Säule mit Unterstandröhrchen gegeben und 2 min bei 13.000 U/min zentrifugiert. Während die DNA-Removing-Säule verworfen wurde, wurden 400 µl 70%iges Ethanol zum Unterstand eines jeden Röhrchen pipettiert, mittels Pipette vermischt und anschließend auf eine PerfectBind-RNA-Säule mit neuem Unterstandröhrchen aufgetragen. Die neue Säule wurde bei 13.000 U/min 1 min zentrifugiert und der Unterstand wurde bei Beibehaltung des Unterstandröhrchens verworfen. Weiterhin wurden 500 µl RNA-Waschpuffer-I auf jede der PerfectBind-RNA-Säulen gegeben.

Nach 5 min Einwirkzeit wurden die Säulen erneut bei 13.000 U/min für 15 sec zentrifugiert und die dazugehörigen Unterstandröhrchen verworfen.

Die Säulen wurden anschließend auf ein neues Unterstandröhrchen gesteckt und für 15 min mit 75 µl DNase-Verdau behandelt.

Nach Ablauf dieser Zeit wurde zuerst 350 µl RNA-Waschpuffer-I dazugegeben und die Säulen bei 13.000 U/min 15 sec zentrifugiert. Anschließend wurde erneut der Unterstand verworfen. Zwei weitere Waschschrirte wurden mit 500 µl RNA-Waschpuffer-II bei zunächst 15-sekündiger und anschließend 2-minütiger Zentrifugation durchgeführt, auch hier wurde der Unterstand verworfen. Die PerfectBind-RNA-Säulen wurden danach auf 1,5 ml-Eppendorf-Tubes befestigt und je nach initialer Zellmenge mit 35 bis 70 µl RNase-freiem-Wasser versehen. Nach 1 min Einwirkzeit wurden die Säulen wiederrum bei 13.000 U/min für 1 min zentrifugiert. Der Unterstand mit der präparierten und abzentrifugierten RNA wurde auf Eis weiterverarbeitet bzw. für maximal 48 h bei -20 °C bis zur weiteren Verwendung eingefroren.

Inhibitor	Konzentrationen A673	Konzentrationen WE-68
AUY922	15 nM	30 nM
VE-821	1 µM	1 µM
KU-55933	5 µM	7,5 µM

Tab. 6: Innerhalb der Experimente zur Genexpressionsanalyse verwendete Konzentrationen der Wirkstoffe

Die verwendeten Konzentrationen wurden anhand der Daten aus Vorversuchen ausgewählt.

4.2.5.3. Photometrische Messung des RNA-Gehaltes und cDNA-Synthese

Um den RNA-Gehalt jeder Probe messen und für die Synthese der komplementären cDNA standardisieren zu können, mussten die erstellten RNA-Präparate photometrisch gemessen werden. Hierzu wurde eine 1:20 Verdünnung mittels 4 µl RNA-Probe und 76 µl RNase-freiem Wasser hergestellt. Die Absorption der Proben wurde anschließend bei 260 und 280 nm gemessen und der ermittelte RNA-Gehalt in µg/µl sowie die Ratio, die ein Maß für die Reinheit der RNA darstellt, wurden festgehalten. Die jeweilige Menge an Probe mit einem RNA-Gehalt von 0,5 µg wurde nachfolgend mittels RNase-freiem Wasser auf ein Zielvolumen von 13 µl aufgefüllt.

Anschließend wurde pro Probe und im Überschuss ein Ansatz mit reverser Transkriptase (Omniscript) hergestellt.

Hierzu wurden je Probe 2 µl Reverse-Transkriptase-Puffer (10fach konzentriert), 2 µl Deoxynukleotid-Mix, 2 µl Random-Hexamer, 0,25 µl RNase-Out und 1 µl reverse Transkriptase in ein Eppendorf-Tube pipettiert.

Anschließend wurden jeder Probe 7 µl dieses Ansatzes hinzugegeben und alle Proben bei 37 °C für 1 h im Thermomixer inkubiert. Die Proben wurden bis zur PCR bei -20 °C eingefroren.

4.2.5.4. Echtzeit RT-PCR

In Vorbereitung auf die eigentliche PCR-Messung wurde für alle Proben ein Mastermix in Eppendorfröhrchen erstellt. Dieser setzte sich bei 25 µl pro Probe aus 11,25 µl RNase-freiem Wasser, 12,5 µl Universal PCR Mastermix und 1,25 µl Primer-Sonden-Mix zusammen und wurde für jede Probe zur Doppelbestimmung sowohl für Ziel- als auch Referenz-Gene erstellt. In den so entstandenen Mastermix von 50 µl pro Probe wurden anschließend 2 µl cDNA pipettiert, das Ergebnis gevortext, abzentrifugiert und zu je 25 µl in eine 96-Well-Platte pipettiert. Zu jedem Gen wurden außerdem zwei Negativ-Kontrollen mit Mastermix, jedoch ohne cDNA, geführt. Der Thermocycler 7900 HAT Fast real-time PCR system von Applied Biosystems wurde anschließend mit folgendem Programm betrieben:

- Stufe 1: Bei 50 °C für 2 min für die Dauer von einem Zyklus.
- Stufe 2: Bei 95 °C für 10 min für die Dauer von einem Zyklus.
- Stufe 3: Bei 95 °C für 15 sec und anschließend bei 60 °C für 1 min für die Dauer von 40 Zyklen.

4.2.5.5. Auswertung der PCR-Ergebnisse

Die durch die PCR festgestellten Expressionslevel der untersuchten Zielgene benötigen einen Bezugspunkt, um eine relative Quantifizierung der Genexpression bei Proben mit unterschiedlichen Mengen an RNA vornehmen zu können. Das konstitutiv in jeder Zelle vorkommende β 2-Mikroglobulin wurde dabei als sogenanntes *housekeeping gene* miterfasst und als solcher Bezugspunkt genutzt.

Der Vergleich der Expressionslevel der zu untersuchenden Zielgene mit dem des $\beta 2$ -Mikroglobulins erlaubt aufgrund der Stabilität dieses *housekeeping genes* eine relative Quantifizierung der Expressionsniveaus.

Trägt man die gemessenen Fluoreszenzsignale gegen die Zyklen der PCR auf, erhält man einen Amplifikationsplot. Dieser erhält durch die Hintergrundfluoreszenz der Sonden eine Basislinie (engl. *baseline*) und eine Schwellenlinie bei einer definierten Fluoreszenzstärke mit einem Vielfachen der Basislinie. Die Summe dieser bis zur Schwellenlinie durchgeführten Zyklen der PCR ergeben den CT-Wert.

Diese CT-Werte werden anschließend genutzt, um anhand der $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$ -Methode die RNA-Quantifizierung vorzunehmen (Schmittgen und Livak 2008). Die $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$ -Methode folgt dieser Rechnung:

$$\Delta CT \text{ Zielsequenz (behandelt, Zielgen)} = \text{Zielgen CT} - \beta 2\text{-Mikroglobulin CT}$$

$$\Delta CT \text{ Kontrolle (unbehandelt, Zielgen)} = \text{Kontrolle CT} - \beta 2\text{-Mikroglobulin CT}$$

$$\Delta\Delta CT = \Delta CT \text{ Zielsequenz} - \Delta CT \text{ Kontrolle}$$

Die erhaltenen $\Delta\Delta CT$ -Werte wurden anschließend als negativer Exponent zur Basis 2 angegeben. Die Doppelbestimmungen wurden des Weiteren in Mittelwerten zusammengefasst, die Mittelwerte dreier Messung anschließend zusammen mit ihrem SEM dargestellt.

5. Ergebnisse

5.1. FACS-Analysen

Um der Fragestellung nach einem potentiellen Synergismus zwischen AUY922 und den Kinaseinhibitoren VE-821 bzw. KU-55933 nachzugehen, wurden beide Zelllinien mit den Wirkstoffen in bereits beschriebener Weise behandelt und im Anschluss daran durchflusszytometrisch hinsichtlich des Zelltodes und des Verlustes mitochondrialer Membranpotentiale untersucht. Um bereits etablierte Therapieregimes zu berücksichtigen, wurden die genannten Substanzen in einer zweiten Versuchsanordnung mit dem in der Therapie des Ewing-Sarkoms fest verankerten Zytostatikum Etoposid kombiniert.

5.1.1. A673

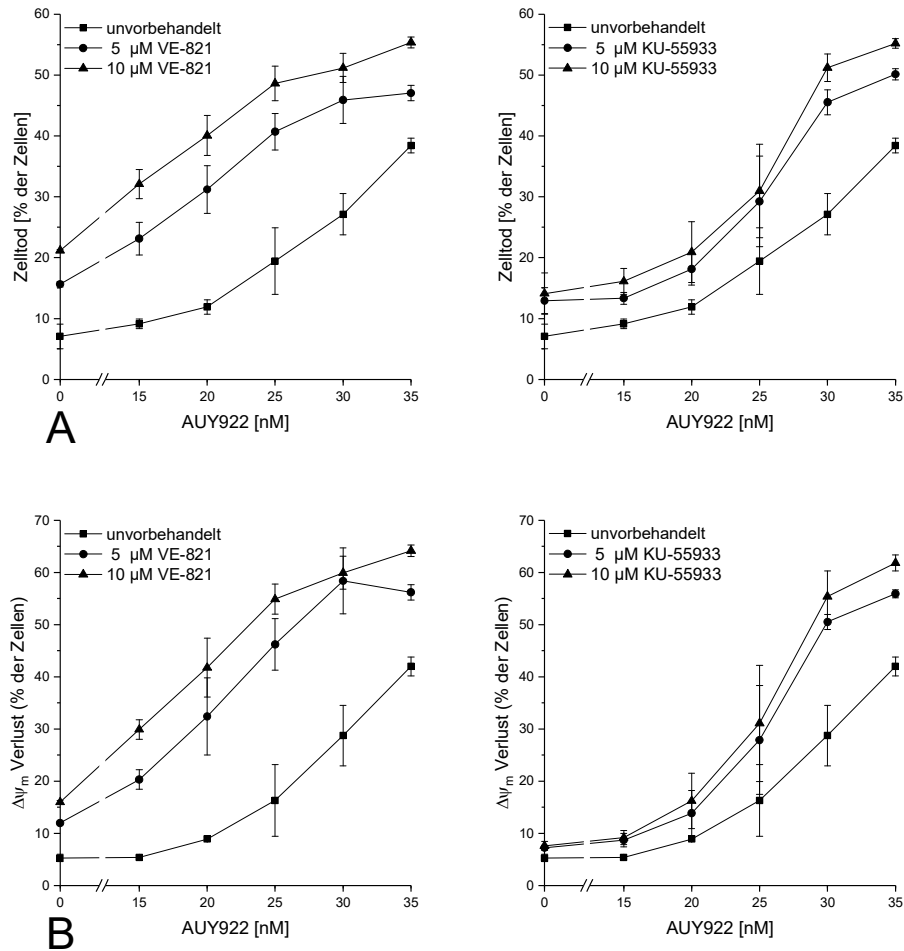


Abb. 3: Auswirkung von AUY922 auf Zelltod (A) und Verlust des $\Delta\Psi_m$ (B) in A673-Zellen bei Vorbehandlung mit VE-821 oder KU-55933

Die A673-Zellen wurden nach Vorinkubation mit einem der beiden Kinase-Inhibitoren VE-821 oder KU-55933 mit verschiedenen Konzentrationen AUY922 für 48 h weiterbehandelt. Die Messung des Zelltodes erfolgte anschließend über die durchflusszytometrische Analyse der PI-Aufnahme. Der Verlust von $\Delta\Psi_m$ wurde durch die Färbung mit DiOC₆(3) bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM dreier Experimente.

Ergebnisse

AUY922 (nM)	VE-821 (µM)	CI VE-821	KU-55933 (µM)	CI KU-55933
15	5	0,953	5	1,772
20	5	0,787	5	0,906
25	5	0,700	5	0,809
30	5	0,735	5	0,691
35	5	0,832	5	0,748
15	10	0,759	10	0,971
20	10	0,664	10	0,808
25	10	0,614	10	0,774
30	10	0,688	10	0,630
35	10	0,724	10	0,682

Tab. 7: CI-Werte für die Zelltodmessung nach Kombinationsbehandlung der A673-Zelllinie mit AUY922, VE-821 und KU-55933

CI-Werte größer 1 sprechen für einen bestehenden Antagonismus, Werte gleich 1 für einen additiven und Werte kleiner 1 für einen synergistischen Effekt der betrachteten Substanzen. Die CI-Werte wurden mit der Software CompuSyn ermittelt.

Während AUY922 allein den Zelltod in bis zu 38,4 % der A673-Zellen induzierte, betrug der Anteil an toten Zellen bei Vorbehandlung mit 5 µM VE-821 bis zu 47 % und bei Kombination mit 10 µM VE-821 bis zu 55,4 %. Die Kombinationsindexanalyse nach der Chou-Talalay-Methode erbrachte für diese Wirkstoffkombination dabei CI-Werte von 0,953–0,700 bzw. 0,759–0,614, was für einen schwachen bis mittleren synergistischen Effekt der Substanzen untereinander spricht. Die Kombination mit KU-55933 führte bei 5 µM des Kinaseinhibitors in 50,1 % der Zellen und bei 10 µM in 55,2 % der Zellen zum Zelltod. Die Kombinationsindexanalyse ergab hier bis auf eine Ausnahme bei der Vorbehandlung mit 5 µM KU-55933 mit einem CI-Wert von 1,772 – und damit einem antagonistischen Effekt – ebenfalls einen Synergismus, wenn auch schwächer ausgeprägt als bei der vorher beschriebenen Wirkstoffkombination mit CI-Werten zwischen 0,906 und 0,691 bzw. 0,971 und 0,630.

Als weiterer Parameter ergab die Messung des Verlustes von $\Delta\Psi_m$ einen solchen in bis zu 42 % der A673-Zellen bei alleiniger Behandlung mit AUY922 und einen Verlust in bis zu 56,2 % der Zellen bei Vorbehandlung mit 5 μM VE-821 bzw. einen Verlust in bis zu 64,2 % der Zellen bei Verwendung von 10 μM VE-821. Eine Vorbehandlung mit KU-55933 bewirkte einen Verlust von $\Delta\Psi_m$ in bis zu 55,9 % der Zellen bei Vorbehandlung mit 5 μM und in bis zu 62 % der Zellen bei Vorbehandlung mit 10 μM KU-55933. Es zeichnete sich dementsprechend dieselbe Tendenz in der Zunahme von Zelltod und Verlust von $\Delta\Psi_m$ ab.

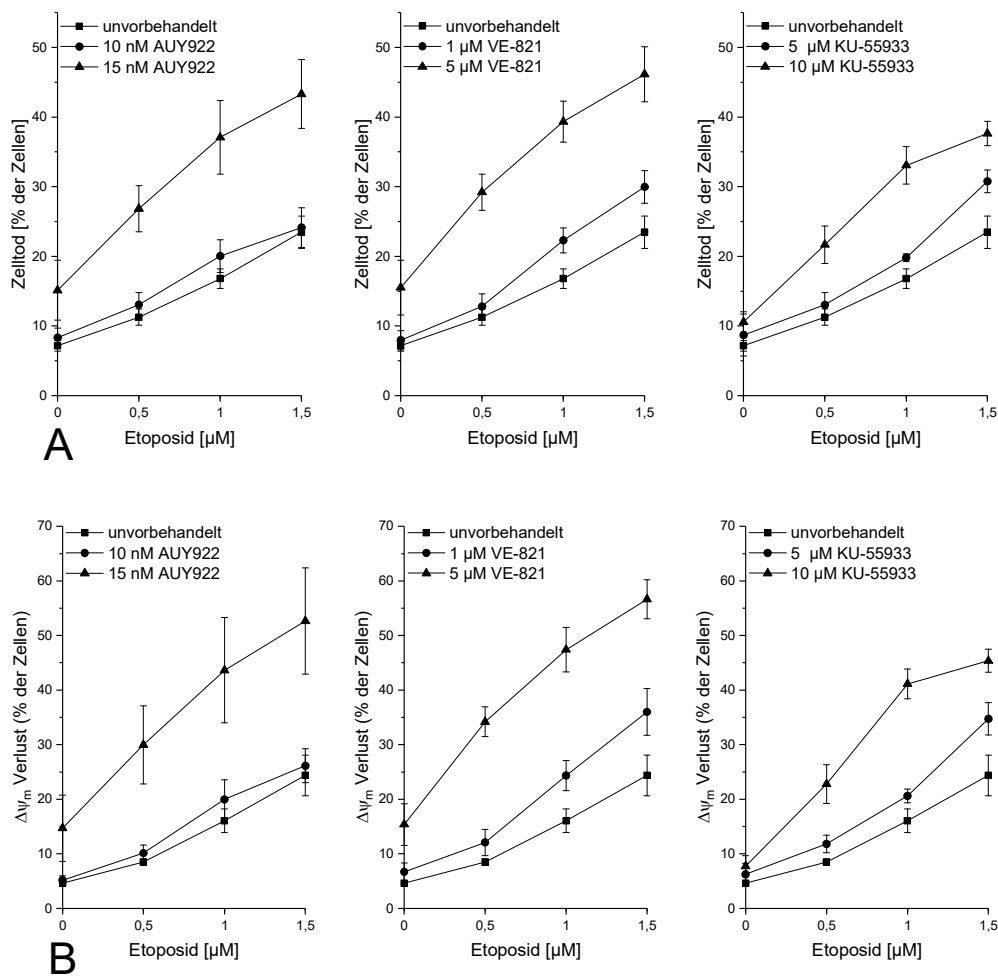


Abb. 4: Auswirkung von Etoposid auf Zelltod (A) und Verlust des $\Delta\Psi_m$ (B) in A673-Zellen bei Vorbehandlung mit AUY922, VE-821 oder KU-55933

Die A673-Zellen wurden nach Vorinkubation mit AUY922 oder mit einem der beiden Kinase-Inhibitoren VE-821 oder KU-55933 mit verschiedenen Konzentrationen von Etoposid für 48 h weiterbehandelt. Die Messung des Zelltodes erfolgte anschließend über die durchflusszytometrische Analyse der PI-Aufnahme. $\Delta\Psi_m$ wurde durch die Färbung mit DiOC₆(3) bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM dreier Experimente.

Etoposid (μM)	AUY922 (nM)	CI AUY	VE-821 (μM)	CI VE-821	KU-55933 (μM)	CI KU-55933
0.5	10	1,509	1	1,105	5	1,053
1	10	1,358	1	0,787	5	0,868
1.5	10	1,386	1	0,656	5	0,592
0.5	15	0,903	5	0,428	10	0,426
1	15	0,780	5	0,333	10	0,360
1.5	15	0,739	5	0,307	10	0,401

Tab. 8: CI-Werte für die Zelltodmessung nach Kombinationsbehandlung der A673-Zelllinie mit Etoposid, AUY922, VE-821 und KU-55933

CI-Werte größer 1 sprechen für einen bestehenden Antagonismus, Werte gleich 1 für einen additiven und Werte kleiner 1 für einen synergistischen Effekt der betrachteten Substanzen. Die CI-Werte wurden mit der Software CompuSyn ermittelt.

Die zweite Reihe an Experimenten mit Wirkstoffkombinationen beinhaltete Etoposid als seit langem in der Ewing-Sarkom-Therapie etabliertes Agens. Dabei induzierte Etoposid allein in bis zu 23,5 % der A673-Zellen den Zelltod. In Kombination mit AUY922 ergab sich ein Anteil toter Zellen von bis zu 24,1 % für 10 nM AUY922 bzw. 43,3 % für 15 nM AUY922. Zusammen mit VE-821 führte Etoposid in 30 % zum Zelltod bei Vorbehandlung mit 1 μ M und in 46,1 % bei Vorbehandlung mit 5 μ M. KU-55933 führte in Verbindung mit Etoposid ebenfalls zu einer Steigerung des prozentualen Anteils toter Zellen mit Werten bis zu 30,8 % für 5 μ M KU-55933 und einem Anteil von 37,6 % bei Vorbehandlung mit 10 μ M. Die Kombinationsindexanalyse lieferte einen Anhalt für einen Antagonismus zwischen Etoposid und AUY922 bei CI-Werten von 1,509–1,358 für die Vorbehandlung mit der niedrigeren der beiden Konzentrationen an AUY922. Die höhere Konzentration an AUY922 geht mit Etoposid einen leichten Synergismus bei CI-Werten zwischen 0,903 und 0,739 ein. Ein leichter bis starker Synergismus des Zytostatikums Etoposid konnte ebenfalls für die Kombination mit VE-821 und KU-55933 bei CI-Werten von 0,787–0,307 bzw. 0,868–0,360 nachgewiesen werden. Eine Ausnahme stellten die niedrigsten Konzentrationen von VE-821 und KU-55933 in Kombination mit Etoposid mit CI-Werten von 1,105 und 1,053 und damit additiven bis antagonistischen Effekten dar.

Der zweite gemessene Parameter des Verlustes von $\Delta\Psi_m$ ergab ein mit der Zelltodanalyse ähnliches Verhalten, mit Verlusten von bis zu 24,4 % bei Behandlung mit Etoposid. Vorbehandlungen mit 10 nM AUY922 führten in bis zu 26,1 % und bei 15 nM AUY922 in bis zu 52,7 % der Zellen zum Verlust von $\Delta\Psi_m$. Vorbehandlungen mit 1 μ M VE-821 zeigten weiterhin einen Verlust von $\Delta\Psi_m$ in bis zu 36 % der Zellen und in bis zu 56,7 % der Zellen bei höheren Konzentrationen mit 5 μ M. Letztlich zeigte auch die Behandlung zusammen mit KU-55933 einen Verlust von $\Delta\Psi_m$ von bis zu 34,7 % bei 5 μ M KU-55933 und von bis zu 45,4 % bei 10 μ M KU-55933.

5.1.2. WE-68

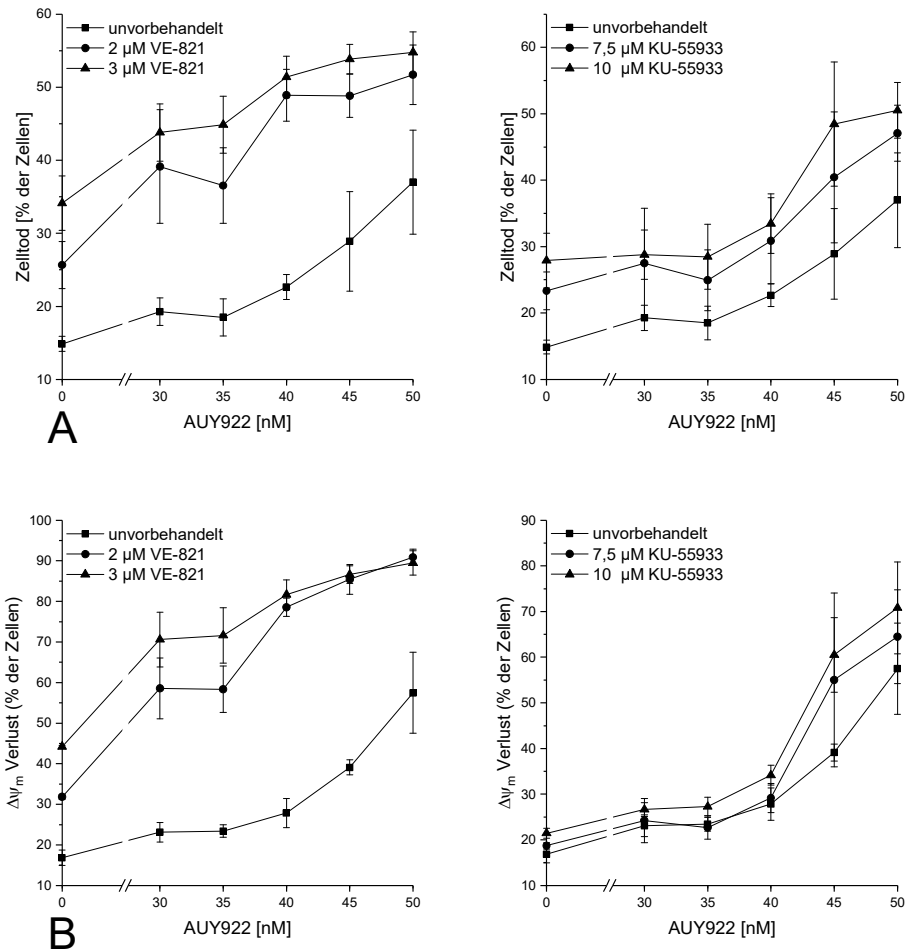


Abb. 5: Auswirkung von AUY922 auf Zelltod (A) und Verlust des $\Delta\Psi_m$ (B) in WE-68-Zellen bei Vorbehandlung mit VE-821 oder KU-55933

Die WE-68-Zellen wurden nach Vorinkubation mit einem der beiden Kinase-Inhibitoren VE-821 oder KU-55933 mit verschiedenen Konzentrationen AUY922 für 48 h weiterbehandelt. Die Messung des Zelltodes erfolgte anschließend über die durchflusszytometrische Analyse der PI-Aufnahme. Der Verlust von $\Delta\Psi_m$ wurde durch die Färbung mit DiOC₆(3) bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM dreier Experimente.

AUY922 (nM)	VE-821 (µM)	CI VE-821	KU-55933 (µM)	CI KU-55933
30	2	1,061	7,5	1,447
35	2	1,229	7,5	1,772
40	2	0,911	7,5	1,500
45	2	0,982	7,5	1,195
50	2	0,966	7,5	1,045
30	3	1,114	10	1,627
35	3	1,154	10	1,813
40	3	1,017	10	1,590
45	3	0,989	10	1,041
50	3	1,028	10	1,020

Tab. 9: CI-Werte für die Zelltodmessung nach Kombinationsbehandlung der WE-68-Zelllinie mit AUY922, VE-821 und KU-55933

CI-Werte größer 1 sprechen für einen bestehenden Antagonismus, Werte gleich 1 für einen additiven und Werte kleiner 1 für einen synergistischen Effekt der betrachteten Substanzen. Die CI-Werte wurden mit der Software CompuSyn ermittelt.

AUY922 induzierte in den WE-68-Zellen bei alleiniger Anwendung den Zelltod in bis zu 37 % der Zellen. Kombiniert mit VE-821 ergaben sich Werte von bis zu 51,7 % bei Vorbehandlung mit 2 µM bzw. bis zu 54,8 % bei Vorbehandlung mit 3 µM des Inhibitors. Die Anwendung von KU-55933 als Vorinkubation führte zur Induktion des Zelltodes in 47,1 % der Zellen bei Konzentrationen von 7,5 µM und in 50,5 % bei Anwendung von 10 µM. Die Kombinationsindexanalyse erbrachte für die Kombination von AUY922 mit VE-821 in beiden Konzentrationen CI-Werte von ca. 1 (1,229–0,911), was einem additiven Effekt entspricht und zeigte mit Werten > 1 (1,813–1,020) für die Kombination von AUY922 und KU-55933 einen bestehenden Antagonismus. Die Messung des $\Delta\Psi_m$ ergab einen Verlust in bis zu 57,5 % der WE-68-Zellen bei alleiniger Behandlung mit AUY922 und einen Nachweis von $\Delta\Psi_m$ -Verlusten in bis zu 90,9 % der Zellen bei Vorbehandlung mit 2 µM VE-821 bzw. in bis zu 89,5 % der Zellen bei Verwendung von 10 µM VE-821.

Kombinationen mit KU-55933 bewirkten einen Verlust von $\Delta\Psi_m$ in bis zu 64,5 % der Zellen bei Vorbehandlung mit 7,5 μM und in bis zu 70,8 % der Zellen bei Vorbehandlung mit 10 μM .

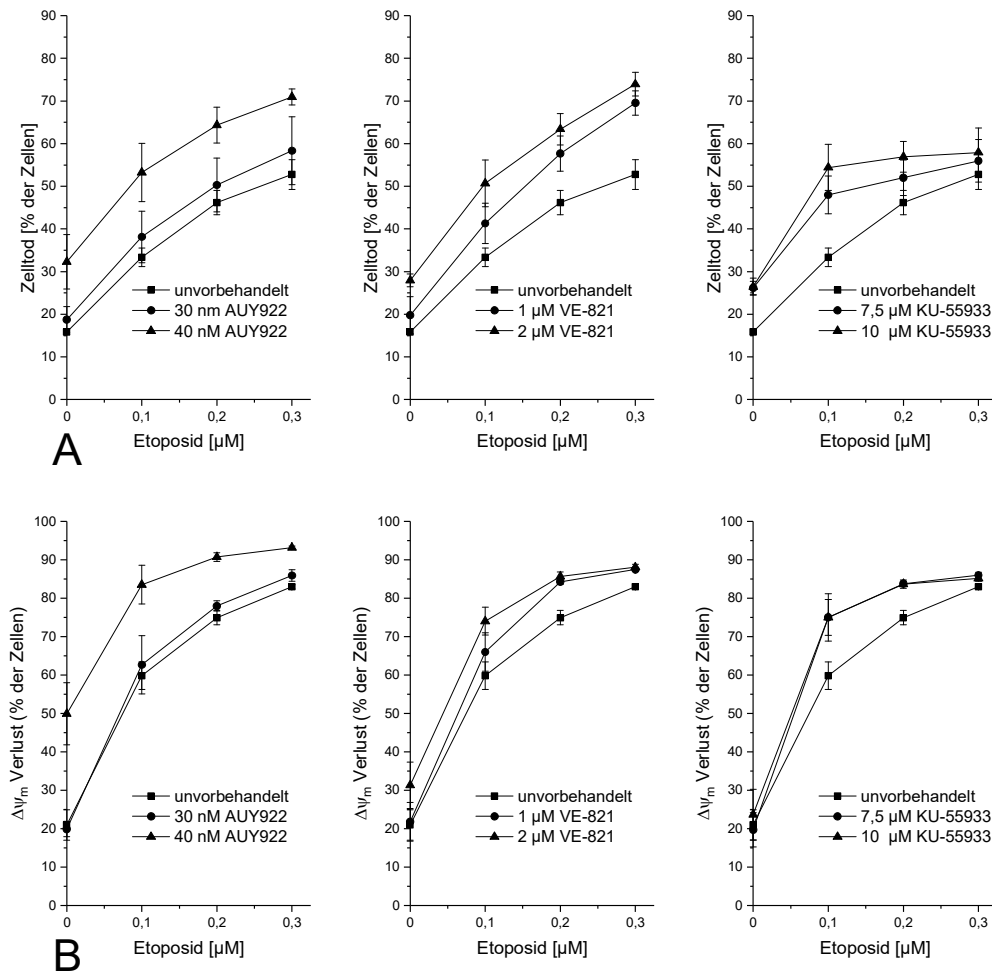


Abb. 6: Auswirkung von Etoposid auf Zelltod (A) und Verlust des $\Delta\Psi_m$ (B) in WE-68-Zellen bei Vorbehandlung mit AUY922, VE-821 oder KU-55933

Die WE-68-Zellen wurden nach Vorinkubation mit AUY922 oder mit einem der beiden Kinase-Inhibitoren VE-821 oder KU-55933 mit verschiedenen Konzentrationen von Etoposid für 48 h weiterbehandelt. Die Messung des Zelltodes erfolgte anschließend über die durchflusszytometrische Analyse der PI-Aufnahme. Der Verlust von $\Delta\Psi_m$ wurde durch die Färbung mit DiOC₆(3) bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM dreier Experimente.

Etoposid (μM)	AUY922 (nM)	CI AUY	VE-821 (μM)	CI VE-821	KU-55933 (μM)	CI KU-55933
0.1	30	1,428	1	0,841	7,5	0,440
0.2	30	1,341	1	0,586	7,5	0,713
0.3	30	1,257	1	0,418	7,5	0,864
0.1	40	1,035	2	0,589	10	0,314
0.2	40	0,948	2	0,491	10	0,546
0.3	40	0,870	2	0,343	10	0,776

Tab. 10: CI-Werte für die Zelltodmessung nach Kombinationsbehandlung der WE-68-Zelllinie mit Etoposid, AUY922, VE-821 und KU-55933

CI-Werte größer 1 sprechen für einen bestehenden Antagonismus, Werte gleich 1 für einen additiven und Werte kleiner 1 für einen synergistischen Effekt der betrachteten Substanzen. Die CI-Werte wurden mit der Software CompuSyn ermittelt.

Etoposid induzierte – bei verhältnismäßig zur Behandlung der A673-Zellen – niedrigen Konzentrationen von 0,1–0,3 μM in einem hohen Anteil von bis zu 52,8 % der WE-68-Zellen den Zelltod. Kombinationen mit AUY922 führten in bis zu 58,3 % bei Vorbehandlung mit 30 nM bzw. 71 % bei Vorinkubation mit 40 nM den Zelltod herbei. Der Anteil toter Zellen lag außerdem bei Vorbehandlung mit 1 μM VE-821 bei 70 % und bei 74 % für 2 μM . KU-55933 induzierte zusammen mit Etoposid den Zelltod in bis zu 56 % der Zellen bei Anwendung von 7,5 μM und in bis zu 58 % bei 10 μM . Die CI-Werte von 1,428–0,870 für diese Messungen legen einen zum Teil antagonistischen und zum Teil additiven Effekt mit Tendenz zum leichten Synergismus bei höheren Konzentrationen an beiden Wirkstoffen zwischen Etoposid und AUY922 nahe; und beschreiben mit CI-Werten von 0,841–0,343 für die Kombination mit VE-821 bzw. 0,864–0,314 für das Zusammenwirken mit KU-55933 synergistische Effekte zwischen Etoposid und den Kinaseinhibitoren VE-821 und KU-55933.

Ein verloren gegangenes $\Delta\Psi_{\text{m}}$ wurde bei Einzelanwendung von Etoposid in 83 % der WE-68-Zellen ermittelt. Kombinationen mit AUY922 führten in bis zu 86 % der Zellen für 30 nM AUY922 bzw. in bis zu 93,2 % der Zellen bei 40 nM AUY922 zum Verlust von $\Delta\Psi_{\text{m}}$.

Eine Vorbehandlung mit VE-821 erreichte dies in bis zu 87,5 % bei einer Vorbehandlung mit 1 μM und in bis zu 88 % bei Vorinkubation mit einer Konzentration von 2 μM . KU-55933 induzierte den Verlust von $\Delta\Psi_m$ in Kombination mit Etoposid bei 7,5 μM in bis zu 86 % der Zellen und bei 10 μM in bis zu 85 %.

5.2. Zellzyklusanalysen

Eukaryotische Zellen benötigen unter anderem zur regelrechten Zellteilung eine intakte DNA. Um die Integrität der DNA zu schützen und diese im Verlauf des fehlerbehafteten Prozesses der Replikation zu prüfen, sind Kontrollmechanismen und -punkte vonnöten. Werden Schädigungen der DNA an diesen Punkten erkannt, verweilt die Zelle solange an diesen Punkten, bis der Schaden behoben ist. Ist dies nicht möglich, wird der programmierte Zelltod eingeleitet.

Um die Mechanismen der Zellschädigung und des Zusammenwirkens der Kinaseinhibitoren mit AUY922 besser verstehen zu können, wurden durchflusszytometrische Zellzyklusanalysen durchgeführt. Anhand der Arretierung von Zellpopulationen an den Kontrollpunkten G1 vom Übergang der G1-Phase zur S-Phase und G2/M am Übergang der G2-Phase zur M-Phase lassen sich Aussagen darüber treffen, ob diese Substanzen DNA-Schäden induzieren und eine Aktivierung der Kontrollpunkte hervorrufen. Ein Anstieg der Zellen der sub-G1-Population ist hingegen ein Hinweis auf bereits fragmentierte DNA und damit ein Maß für apoptotische Zellen. Werden Zellen an den Kontrollpunkten arretiert oder apoptotisch, sinkt dementsprechend auch die Anzahl der in den anderen Fraktionen enthaltenen Zellen.

Der HSP90-Inhibitor AUY922 und der ATM-Inhibitor KU-55933 führten in beiden Zelllinien zu keiner Aktivierung von Kontrollpunkten. Es zeichnete sich jedoch ein Anstieg der sub-G1-Populationen mit apoptotischen Zellen ab, der nach Behandlung mit AUY922 stärker ausfiel. VE-821 konnte demgegenüber einen G1-Arrest bei 1 μM in WE-68-Zellen induzieren ($p = 0,00844$). In den A673-Zellen zeigte sich ein ähnlicher Effekt, jedoch ohne statistische Signifikanz.

Ergebnisse

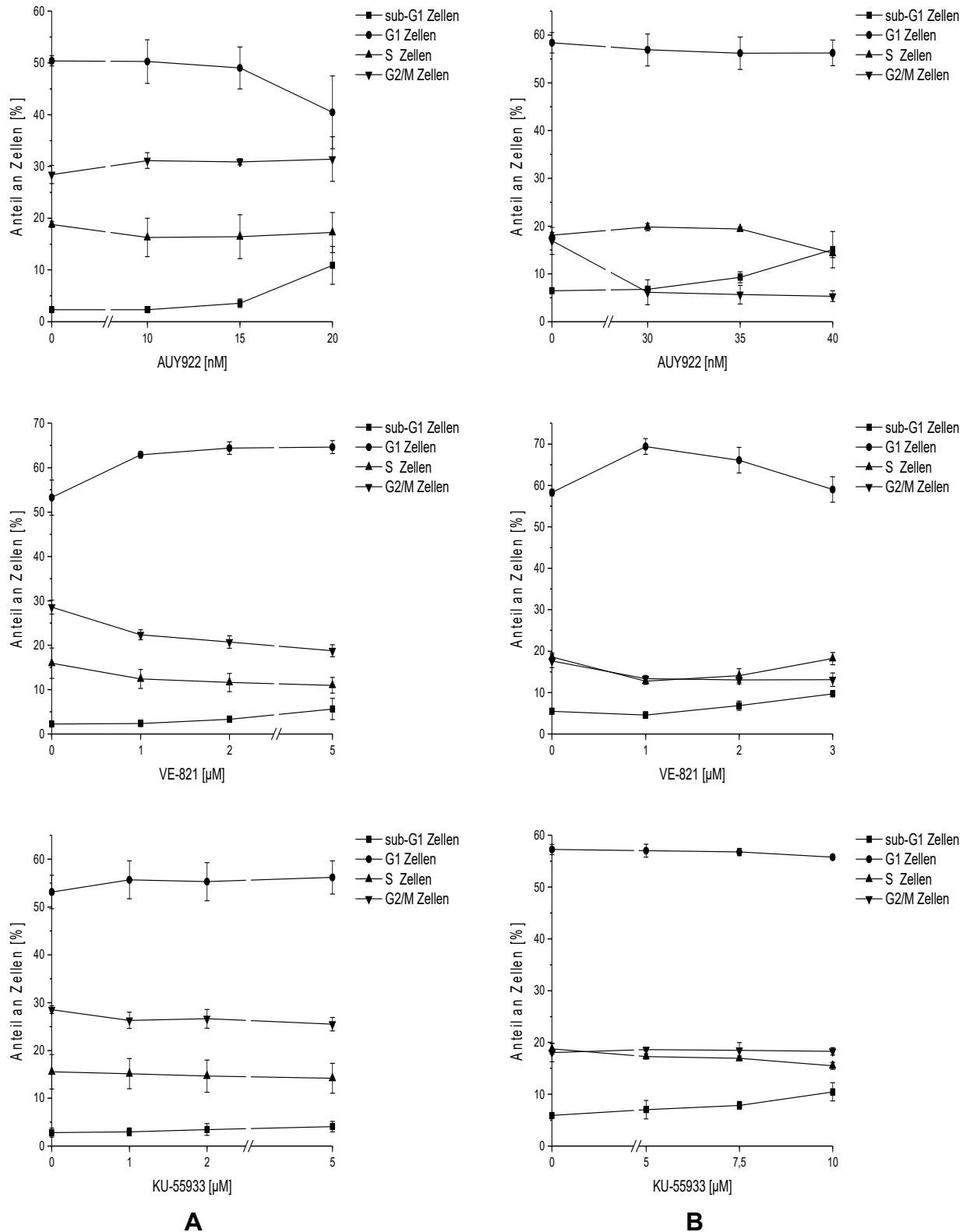


Abb. 7: Auswirkungen der getesteten Inhibitoren auf den Zellzyklus von A673-Zellen (A) und WE-68-Zellen (B) Die Zellen wurden über 48 h behandelt. Zur Erstellung des Zellzyklusprofils wurde der DNA-Gehalt über die PI-Einfärbung gemessen. Dargestellt sind die Mittelwerte dreier Einzelmessungen sowie Standardmittelwertabweichungen.

5.3. Western Blots

Die folgenden Western Blots zeigen die intrazellulären Veränderungen im Proteinhaushalt beider Zelllinien unter Exposition mit AUY922. Dargestellt werden zwei Versuchsreihen mit aufsteigenden Konzentrationen von 20 bis 30 nM bzw. 15 bis 50 nM über Zeiträume von 24 bis 48 bzw. 2 bis 24 h. Es wurden also jene Konzentrationen und Inkubationszeiten verwendet, die auch zur Untersuchung der Zytotoxizität innerhalb der FACS-Analysen verwendet wurden. Um eine gleichmäßige Verteilung der Proteinmengen innerhalb der Gelelektrophoresetaschen und eine korrekte Übertragung auf die Membranen zu kontrollieren, wurden Ladekontrollen anhand des ubiquitär und konstitutiv exprimierten Proteins Actin bzw. Vinculin mitgeführt.

Während die Konzentrationen an pH2AX in der Kontrolle der A673-Zellen bereits erhöht waren und mit steigender Applikationsdauer des HSP90-Inhibitors absanken, induzierte AUY922 in der Zelllinie WE-68 eine kontinuierliche Akkumulation von pH2AX als indirektes Maß für DNA-Schäden. Darüber hinaus zeigte sich in beiden Zelllinien eine Beeinträchtigung der ATR-Proteinlevel, wobei die ATR-Level mit steigenden Konzentrationen von AUY922 in A673-Zellen zunächst ab- und anschließend zunahm und innerhalb der WE-68-Zellen kontinuierlich abnahmen und auf eine Interaktion von ATR mit HSP90 hinweisen könnten. CHK1 und seine phosphorylierte Form akkumulierten nach AUY922-Behandlung in A673-Zellen, während die CHK1-Level in WE-68-Zellen bei konstanten Phosphorylierungsebenen stetig abnahmen. Die Phosphorylierungen von ATR und CHK1 zeigten in A673-Zellen damit eine gemeinsame Tendenz und einen Hinweis auf einen Effekt auf den Zellzyklusarrest. Der intrazelluläre Gehalt an PARP1 stellte sich in beiden Zelllinien als weitgehend konstant dar, wohingegen seine gespaltene Form korrelierend mit den Mengen an phosphorylierter CHK1 einen leichten, konzentrationsabhängigen Anstieg als weiteres Zeichen der DNA-Schädigung, des Zellzyklusarrestes und der Initiierung der DNA-Reparaturmechanismen verzeichnete.

In beiden Zelllinien zeigte sich eine konzentrationsabhängige Verringerung in den Proteinspiegeln von ATM, wobei sich diese Tendenz stärker in WE-68-Zellen darstellte.

Phosphoryliertes ATM nahm zusammen mit der Gesamtproteinkonzentration von ATM in WE-68-Zellen ab, zeigte aber in A673-Zellen nach einer anfänglichen Abnahme bei 20 nM über beide Zeiträume einen erneuten Anstieg bei 30 nM.

Die Zunahme an ATM-Phosphorylierungen bei höheren Konzentrationen an AUY922 korrelierte dabei in A673 mit einem vermehrten Anfall an gespaltenen Caspase 3, die hier als Marker für die Apoptose erfasst wurde. HSP90 selbst erfuhr durch AUY922 eine Inhibierung, die zu einer vermehrten Synthese des Proteins in A673-Zellen führte. In WE-68-Zellen war dieser Effekt nicht deutlich erkennbar. Sowohl BRCA1 als auch CHK2 wurden als Klienten von AUY922 in beiden Zelllinien konzentrationsabhängig depletiert. MDM2 schien bei steigenden Konzentrationen von AUY922 in WE-68-Zellen zu akkumulieren, was durch die später durchgeführte Echtzeit RT-PCR bestätigt wurde.

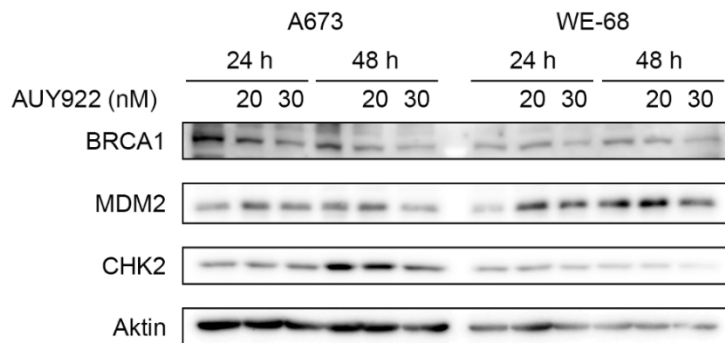
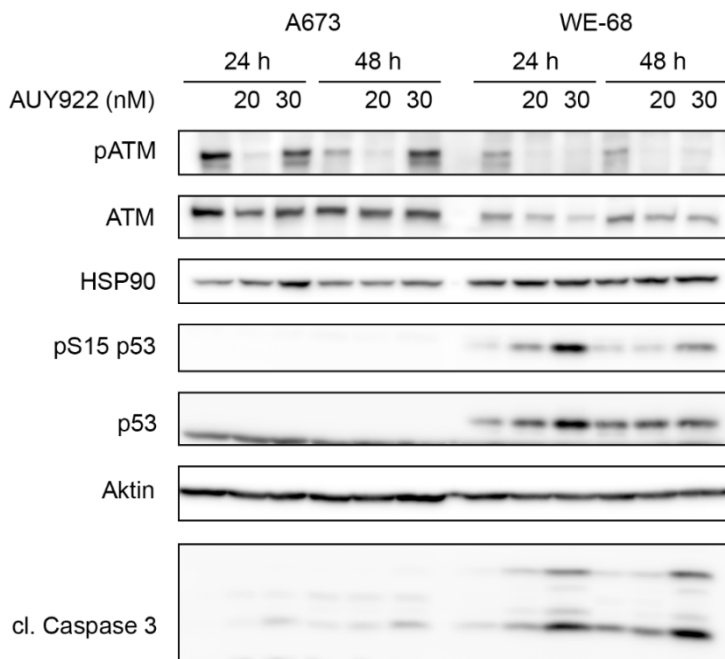
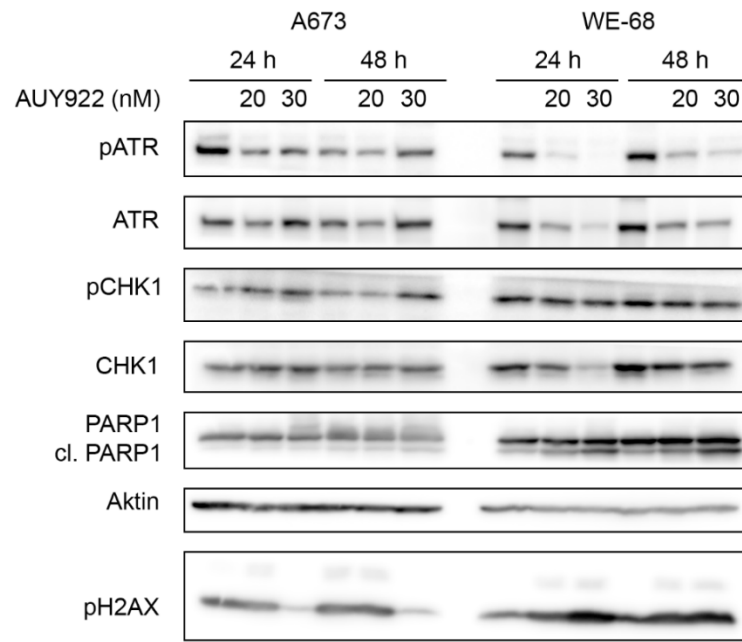


Abb. 8: Beeinflussung intrazellulärer Proteinkonzentrationen und -

phosphorylierungen in A673- und WE-68-Zellen.

Zellen beider Zelllinien wurden über 24 und 48 h mit Konzentrationen von 20 und 30 nM AUY922 behandelt. Die Veränderungen der Proteinkonzentrationen oder -phosphorylierungen wurden anschließend durch Western Blots festgestellt.

Um die Effekte nach einer Kurzzeitinkubation über 2 h auf Protein- und Phosphorylierungslevel mit denen nach einer eintägigen Inkubation vergleichen zu können, wurde eine zweite Versuchsreihe durchgeführt, in der außerdem das Verhalten weiterer Proteine untersucht wurde. Es ergab sich wie zuvor eine ähnliche Induktion von DNA-Schäden anhand von gemessenem pH2AX in WE-68-Zellen, erhöhte basale Werte an pH2AX in unbehandelten A673-Zellen und eine kontinuierliche Zunahme nach Behandlung über 24 h. ATR zeigte in beiden Zelllinien mit steigender Konzentration an AUY922 erhöhte Phosphorylierungen, die sich zusammen mit dem Gesamtproteingehalt an ATR bei der maximalen Konzentration und Behandlungsdauer regredient zeigten. Das ebenfalls an der DNA-Reparatur beteiligte BRCA1 zeigte in beiden Zelllinien eine leichte Induktion nach 2 h Inkubationszeit als Zeichen früher DNA-Schädigung sowie eine kontinuierliche Depletion nach 24 h aufgrund der Abhängigkeit von HSP90. Beim Fusionsprotein EWS-FLI1 bzw. seinen Komponenten EWS und FLI1 konnte kein der Behandlungsdauer oder Wirkstoffmenge entsprechendes Verhalten gefunden werden. Stattdessen zeigten sich die Gehalte dieses Proteins bzw. seiner Komponenten weitestgehend konstant. AUY922 induzierte bei höheren Konzentrationen in der zweiten Versuchsreihe über 24 h einen deutlichen Anstieg von HSP90 im Sinne einer Hitze-Schock-Reaktion. Es ließen sich außerdem sowohl über 2 h als auch über 24 h eine Akkumulation von p53 und seiner phosphorylierten Form sowie von MDM2 in WE-68-Zellen nachweisen. Während die Konzentrationen an ATM in beiden Zelllinien nach 2 h Behandlung mit AUY922 zunahmen, wurde das Protein über einen längeren Zeitraum von 24 h depletiert. Die gespaltene Effektorcaspase 3 verzeichnete in beiden Zelllinien einen konzentrationsabhängigen Anstieg, der über 24 h deutlicher zu sehen war. CHK1 akkumulierte bei kurzer Anwendungsdauer über 2 h bzw. bei längerer Anwendungsdauer bei niedrigeren Konzentrationen bis zu 30 nM in beiden Zelllinien. Höhere Konzentrationen über eine längere Anwendungsdauer führten zur Depletion. CHK2 und PARP1 zeigten hingegen nur bei kurzen Inkubationszeiten in beiden Zelllinien eine Akkumulation und eine kontinuierliche konzentrationsabhängige Depletion nach 24 h, wobei die gespaltene Form von PARP1 mit steigender Konzentration und Inkubationszeit zunahm und erneut eine Notwendigkeit der DNA-Reparatur anzeigte.

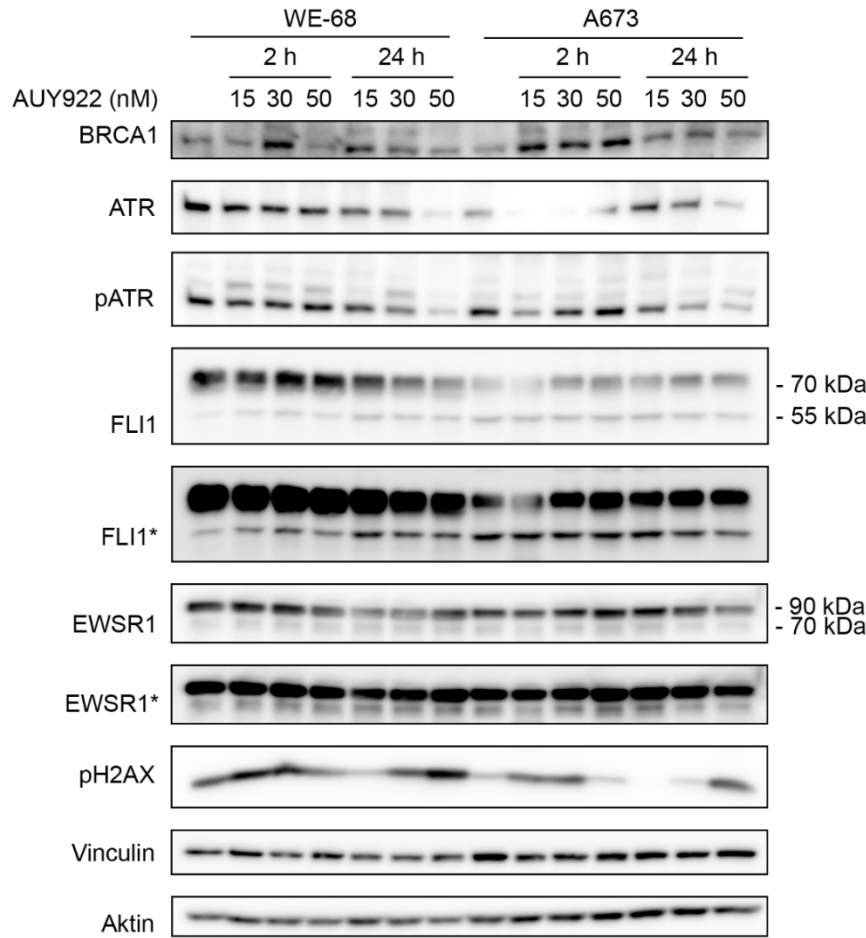
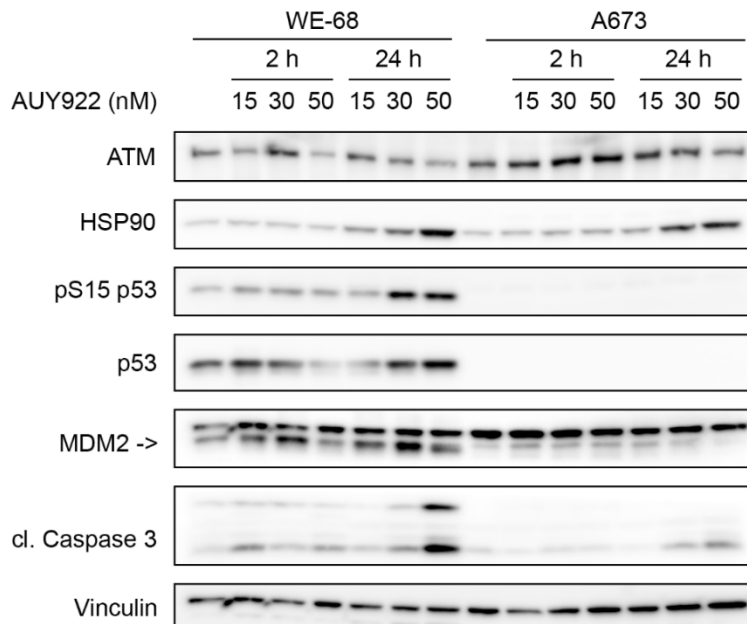
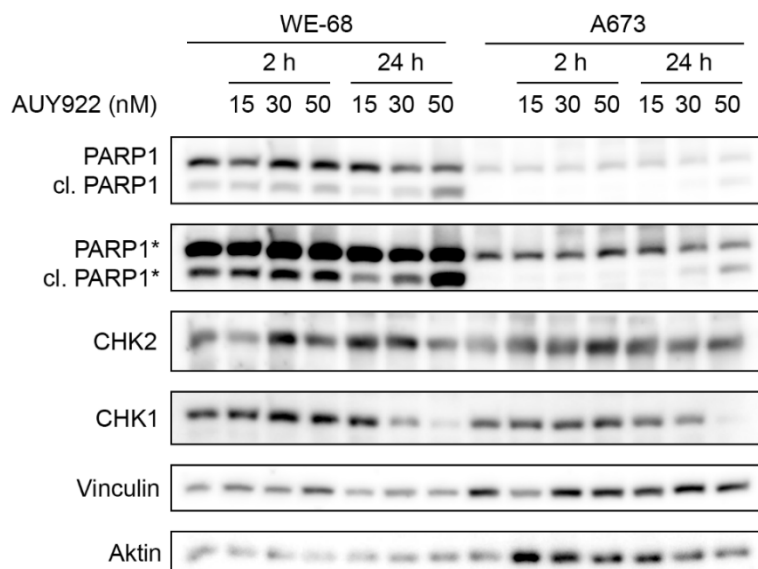


Abb. 9: Beeinflussung intrazellulärer Proteinkonzentrationen und -phosphorylierungen in A673- und WE-68-Zellen.

Zellen beider Zelllinien wurden über 2 und 24 h mit Konzentrationen von 15, 30 und 50 nM AUY922 behandelt. Die Veränderungen der Proteinkonzentrationen oder -phosphorylierungen wurden anschließend durch Western Blots festgestellt.



Ergebnisse



5.4. Echtzeit RT-PCR

Die Effekte auf die Genexpression in A673- und WE-68-Zellen durch Einzel- und Kombinationsbehandlungen mit den Inhibitoren VE-821, KU-55933 und AUY922 in oben beschriebenen Konzentrationen wurden mittels Echtzeit RT-PCR erhoben. Im Zuge dessen wurden die Ergebnisse der Messungen mit einem Effekt größer als $\pm 0,5$ in die weitere Betrachtung eingeschlossen. Es wurden die Effekte auf die Genexpression einer Reihe von anti- und proapoptotischen Proteinen, von Proteinen im p53-Signalweg, von EWS-FLI1 und HIF1A untersucht. Von diesen Genen zeigten nur BAX, PUMA, p21 und MDM2 in WE-68-Zellen deutliche Veränderungen.

5.4.1. Proapoptotische Proteine

Während sich in A673-Zellen kein Effekt auf die Expression des BAX-Gens durch die Behandlung zeigte, stellte sich eine Hochregulation des Gens nach Behandlung mit AUY922 ($p = 0,0218$) und der Kombination aus AUY922 und VE-821 ($p = 0,0487$) oder KU-55933 ($p = 0,0418$) in WE-68-Zellen heraus. Der maximale Effekt wurde dabei durch die Kombination von AUY922 mit VE-821 erreicht.

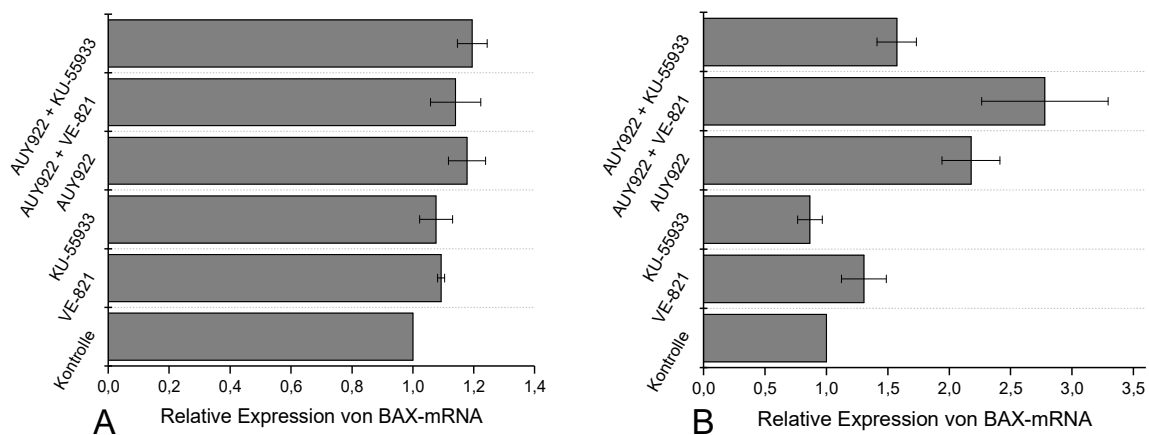


Abb. 10: Genexpression von BAX in A673-Zellen (A) und WE-68-Zellen (B)

Die Zellen wurden einer Einzel- oder Kombinationsbehandlung mit AUY922, VE-821 und KU-55933 über 24 h ausgesetzt und die Genexpression anschließend via Echtzeit RT-PCR ermittelt. Dargestellt sind die Mittelwerte dreier Einzelmessungen sowie die Standardmittelwertabweichungen.

Die Expression des BIM-Gens verzeichnete einen Anstieg in A673-Zellen nach Behandlung mit KU-55933 ($p = 0,0073$), AUY922 ($p = 0,0217$) und der Kombination von AUY922 mit VE-821 ($p = 0,0314$) und KU-55933 ($p = 0,0143$). Die stärksten Effekte zeigten sich dabei nach Behandlung mit AUY922 und der Kombination des HSP90-Inhibitors mit beiden Kinaseinhibitoren.

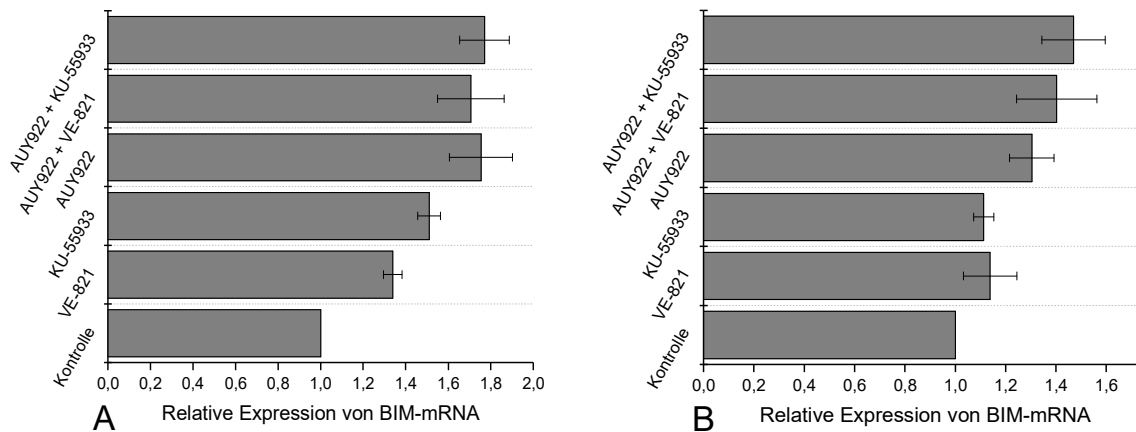


Abb. 11: Genexpression von BIM in A673-Zellen (A) und WE-68-Zellen (B)

Die Zellen wurden einer Einzel- oder Kombinationsbehandlung mit AUY922, VE-821 und KU-55933 über 24 h ausgesetzt und die Genexpression anschließend via Echtzeit RT-PCR ermittelt. Dargestellt sind die Mittelwerte dreier Einzelmessungen sowie die Standardmittelwertabweichungen.

Die gesteigerte Genexpression von NOXA zeigte sich in beiden Zelllinien bei Behandlung mit AUY922 allein (WE-68: $p = 0,0132$; A673: $p = 0,0187$) und in größerem Maße nach einer Kombinationsbehandlung aus AUY922 und VE-821 (WE-68: $p = 0,0418$; A673: $p = 0,0633$). Der letzte Effekt erreichte dementsprechend keine statistische Signifikanz in A673-Zellen.

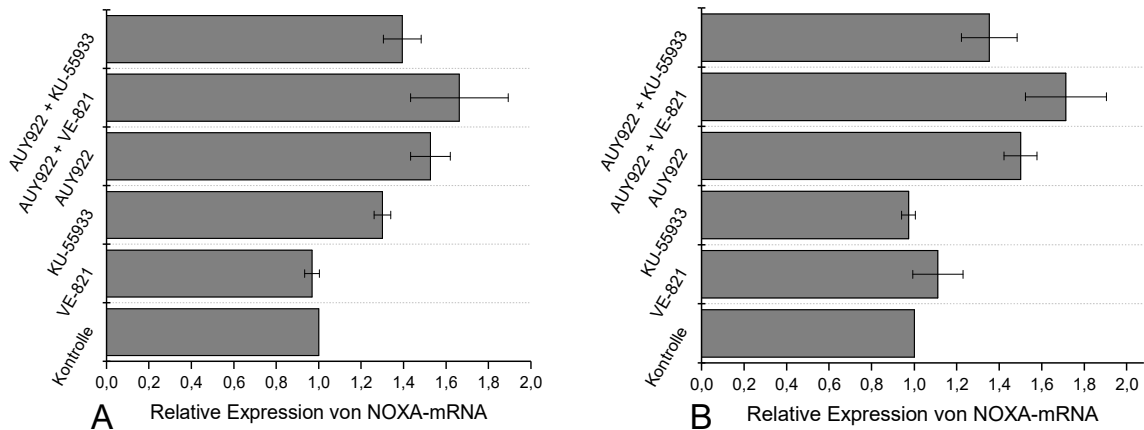


Abb. 12: Genexpression von NOXA in A673-Zellen (A) und WE-68-Zellen (B)

Die Zellen wurden einer Einzel- oder Kombinationsbehandlung mit AUY922, VE-821 und KU-55933 über 24 h ausgesetzt und die Genexpression anschließend via Echtzeit RT-PCR ermittelt. Dargestellt sind die Mittelwerte dreier Einzelmessungen sowie die Standardmittelwertabweichungen.

Die Erhebung der Expressionslevel des PUMA-Gens zeigte keine bedeutenden Effekte in A673-Zellen. Im Kontrast dazu zeigte sich in den p53-Wildtyp WE-68-Zellen eine starke Induktion des Genes bei allen Behandlungen mit Ausnahme der Proben nach Behandlung mit KU-55933. Dies lässt sich am ehesten damit begründen, dass KU-55933 die Aktivität von ATM, welches wiederum p53 durch Phosphorylierungen in seinen aktiven Zustand versetzt, reduziert. Folglich lässt sich auch eine verringerte Hochregulation nach Kombinationsbehandlung mit AUY922 und KU-55933 im Vergleich zur alleinigen Anwendung von AUY922 festhalten. Die maximale Hochregulation zeigt das Gen nach Behandlung der Zellen mit AUY922 in Kombination mit VE-821. Während die Ergebnisse der Kombinationsbehandlung mit AUY922 und KU-55933 als statistisch nicht signifikant aufzufassen sind ($p = 0,0795$), zeigte sich nach Behandlung mit VE-821 ($p = 0,0538$), AUY922 ($p = 0,0553$) und der Kombination aus beiden ($p = 0,0505$) ein Trend zur Signifikanz.

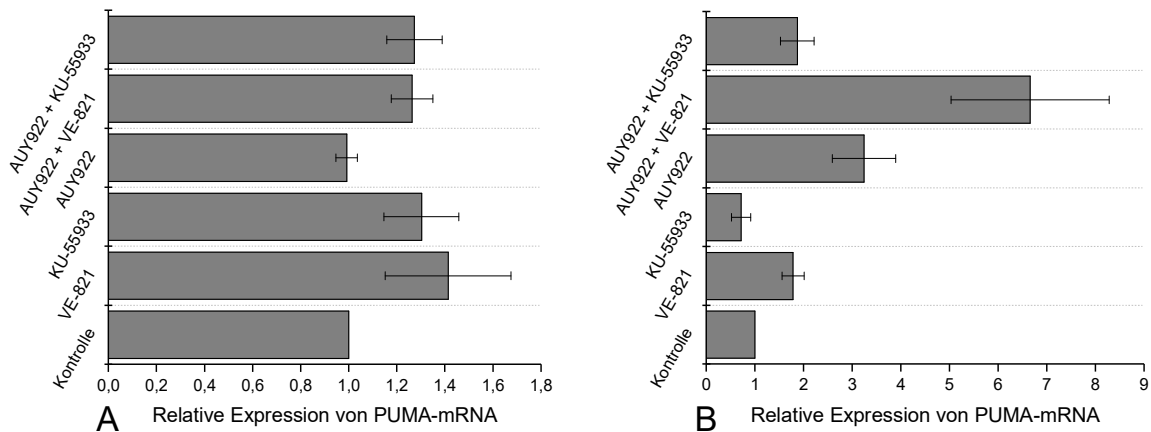


Abb. 13: Genexpression von PUMA in A673-Zellen (A) und WE-68-Zellen (B)

Die Zellen wurden einer Einzel- oder Kombinationsbehandlung mit AUY922, VE-821 und KU-55933 über 24 h ausgesetzt und die Genexpression anschließend via Echtzeit RT-PCR ermittelt. Dargestellt sind die Mittelwerte dreier Einzelmessungen sowie die Standardmittelwertabweichungen.

5.4.2. TP53 und MDM2

Die Genexpression von TP53 zeigte nach Anwendung der Wirkstoffe keine wesentlichen Änderungen in WE-68-Zellen. Entsprechend der Aktivität von akkumuliertem TP53 als Transkriptionsfaktor von MDM2 ließ sich für letzteres eine erhöhte Expression nach AUY922 Einzelbehandlung ($p = 0,0699$) und nach Kombination mit VE-821 ($p = 0,1261$) feststellen. Dabei erreichte die Genexpression von MDM2 ihr Maximum nach Kombination von AUY922 mit VE-821. Erneut zeigte sich nach der Kombination mit KU-55933 eine im Vergleich zur alleinigen Behandlung mit AUY922 reduzierte Expression, was sich durch die indirekt reduzierte Aktivierung von TP53 nach ATM-Inhibierung erklären lässt. Die beobachteten Effekte gingen mit einer hohen Varianz einher und konnten keine statistische Signifikanz vorweisen.

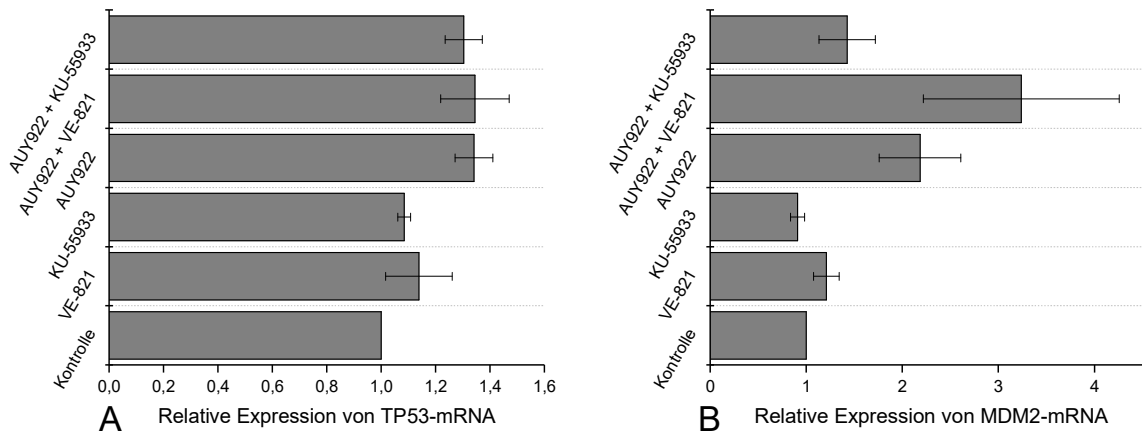


Abb. 14: Genexpression von TP53 (A) und MDM2 (B) in WE-68-Zellen

Die Zellen wurden einer Einzel- oder Kombinationsbehandlung mit AUY922, VE-821 und KU-55933 über 24 h ausgesetzt und die Genexpression anschließend via Echtzeit RT-PCR ermittelt. Dargestellt sind die Mittelwerte dreier Einzelmessungen sowie die Standardmittelwertabweichungen.

5.4.3. CDKN1A

Die Expression des für p21 codierenden Genes CDKN1A erfuhr erwartungsgemäß keine Veränderung nach Behandlung in A673-Zellen. Im Vergleich hierzu steigerte sich das Expressionslevel von CDKN1A in WE-68-Zellen nach der Behandlung mit AUY922 ($p = 0,0772$) und dessen Kombination mit VE-821 ($p = 0,1126$) um ein Vielfaches. Einzelbehandlungen mit VE-821 führten ebenfalls zu Steigerungen der Expression ($p = 0,1007$). Es zeigte sich nach alleiniger Behandlung mit KU-55933 ($p = 0,0047$) eine verminderte Genexpression und eine im Vergleich zur Einzelbehandlung mit AUY922 verringerte Hochregulation bei Kombination von KU-55933 mit AUY922 ($p = 0,2100$). Wiederum gingen die beobachteten Effekte mit einer hohen Varianz einher und konnten mit Ausnahme der unterdrückten Transkription nach alleiniger Anwendung von KU-55933 keine statistische Signifikanz vorweisen.

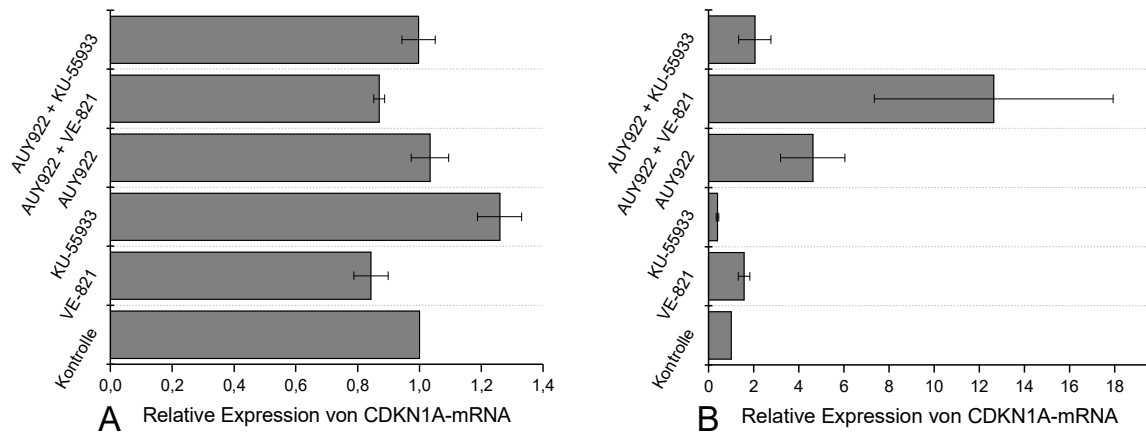


Abb. 15: Genexpression von CDKN1A in A673-Zellen (A) und WE-68-Zellen (B)

Die Zellen wurden einer Einzel- oder Kombinationsbehandlung mit AUY922, VE-821 und KU-55933 über 24 h ausgesetzt und die Genexpression anschließend via Echtzeit RT-PCR ermittelt. Dargestellt sind die Mittelwerte dreier Einzelmessungen sowie die Standardmittelwertabweichungen.

6. Diskussion

In dieser Arbeit sollte das Potential der HSP90-Inhibition durch AUY922 in Ewing-Sarkomzellen untersucht werden. Es wurde dabei der Zelltod nach Behandlung mit unterschiedlichen Konzentrationen an AUY922 in zwei repräsentativen Zelllinien mit unterschiedlichem Status im p53-Gen gemessen und nach synergistischen Effekten mit Kinaseinhibitoren des DNA-Schadensantwort-Systems gesucht. Die gemessenen Effekte wurden mit denen einer Kombinationsbehandlung unter Verwendung von Etoposid verglichen. Um Hinweise auf die Mechanismen zu finden, die Synergien zwischen AUY922 und den Kinaseinhibitoren bedingen könnten, wurden zusätzlich Zellzyklusanalysen, Western Blots und Echtzeit RT-PCRs beider Zelllinien nach Wirkstoffexposition angefertigt. Es konnte dargestellt werden, dass AUY922 synergistische Effekte mit VE-821 und KU-55933 in A673-Zellen, nicht aber in WE-68-Zellen eingeht. Ein schwacher Synergismus konnte außerdem bei höherer Wirkstoffapplikation zusammen mit Etoposid in beiden Zelllinien nachgewiesen werden. AUY922 zeigte keine relevanten Wirkungen auf das Zellzyklusprofil, während VE-821 in WE-68-Zellen einen G1-Arrest bewirkte. Die angefertigten Western Blots zeigten einen proapoptotischen Effekt von AUY922 in beiden Zelllinien und weisen darüber hinaus auf eine DNA-schädigende Wirkung des HSP90-Inhibitors hin. Die Genexpressionsanalyse ergab eine Hochregulation von proapoptotischen Genen in beiden Zelllinien, wobei diese in WE-68-Zellen vermutlich auf der Expressionssteigerung von Genen im p53-Signalweg beruhte.

6.1. HSP90-Inhibitoren in pädiatrisch-onkologischen

Fragestellungen

Eine Reihe von pädiatrischen Tumoren steht im Fokus der Bestrebungen, neue Therapieansätze unter Verwendung von HSP90-Inhibitoren zu etablieren. Unter diesen befinden sich unter anderem das Osteosarkom (Bagatell et al. 2005, McCleese et al. 2009), das Neuroblastom (Bagatell et al. 2005, Regan et al. 2011), das Rhabdomyosarkom (Lesko et al. 2007) und das Ewing-Sarkom (Ambati et al. 2014, Heske et al. 2016), das auch ein zentrales Thema dieser Arbeit ist.

Da die Funktion von HSP90 eine Vielzahl von Signalwegen trägt, haben Ambati et. al. 2014 die Wirkung des HSP90-Inhibitors PU-H71 in den Ewing-Sarkomzelllinien A673 und SK-PN-DW untersucht und die Auswirkungen auf Klientenproteine dargestellt.

PU-H71 führte im Zuge dessen zu einer Depletion unter anderem von Akt, c-MYC, c-Kit, IGF-1R, hTERT und EWS-FLI1 und darüber hinaus zu einem G2/M-Arrest in Ewing-Sarkomzellen. Ambati et. al. beobachteten zudem einen Synergismus mit dem Proteasom-Inhibitor Bortezomib unter der Hypothese, dass eine durch die Inhibition von HSP90 hervorgerufene Akkumulation fehlgefalteter Proteine bei Dysfunktion des Proteasoms zum Zelltod führt.

Die Gruppe zeigte zudem, dass c-Myc und hTERT durch EWS-FLI1 im Ewing-Sarkom hochreguliert werden. Eine Behandlung mit PU-H71 führte anschließend zur Depletion aller drei onkogenen Proteine (Ambati et al. 2014). Eine weitere Depletion erfuhr c-Kit, dessen Mutationen im Ewing-Sarkom beschrieben wurden und mit einer erhöhten Rate an pulmonalen Metastasen einhergingen (Landuzzi et al. 2000, Ambati et al. 2014). Diese Depletion ging des Weiteren mit einer geringeren Metastasierung in vivo einher (Ambati et al. 2014). PU-H71 vermochte es in diesem Zusammenhang außerdem, IGF-1R zu depletieren. In einer anderen Arbeit zeigten IGF-1R-Antikörper zuvor antitumoröse Effekte auf Ewing-Sarkomzellen (Martins et al. 2008). Diese Zellen wurden zum Teil durch eine kompensatorische Erhöhung von intrazellulärem HSP90 refraktär gegen die Anti-IGF-1R-Behandlung. Der HSP90-Inhibitor Geldanamycin konnte die Sensibilität solcher Zellen für eine Anti-IGF-1R-Behandlung wiederherstellen (Martins et al. 2008). Die beobachtete Depletion von IGF-1R nach HSP90-Inhibition durch Ambati et. al. könnte diesen Effekt erklären. In-vitro-Versuche deuten zudem auch darauf hin, dass eine Inhibition von HSP90 neben einer gesteigerten Apoptose auch zu einem erhöhten Maß an Autophagie im Sinne eines zellulären Schutzmechanismus oder beginnendem Zelltodes führen könnte, wobei diese Daten der Anwendung des HSP90-Inhibitors Geldanamycin an Osteosarkomzellen zugrunde liegen (Mori et al. 2015).

Eine weitere Therapiestrategie zur Behandlung des Rhabdomyo- und Ewing-Sarkoms könnte in der Konjugation von Chemotherapeutika an HSP90-Inhibitoren bestehen.

STA-8666 stellt einen solchen Konjugatwirkstoff dar, der sich eines HSP90-Inhibitors bedient, um die Distribution von SN-38, des aktiven Metaboliten von Irinotecan, an Tumorzellen zu steigern (Heske et al. 2016).

Dieser Umstand liegt vermutlich dem Mechanismus zugrunde, nach dem sich HSP90-Inhibitoren aufgrund ihrer Pharmakokinetik in höheren Konzentrationen und über längere Zeiträume in Tumorgeweben anreichern als in normalem Gewebe (Heske et al. 2016).

Die Ursache dafür könnten u. a. erhöhte HSP90-Konzentrationen in Tumorgewebe oder bestimmte in malignen Zellen stattfindende posttranslationale Modifikationen des Chaperons darstellen (Heske et al. 2016).

6.2. Synergismen von AUY922 und VE-821 oder KU-55933 in A673-Zellen

Die Kombinationsbehandlung unter Verwendung von AUY922 und einem der beiden Kinaseinhibitoren von A673- und WE-68-Zellen erzielte unterschiedliche Verhaltensweisen im Hinblick auf synergistische Effekte. Kombinationsbehandlungen von A673-Zellen zeigten leichte bis mittlere synergistische Effekte für beide Kombinationen, während die Kombination von AUY922 mit VE-821 in WE-68-Zellen vorrangig additive und die Kombination von AUY922 mit KU-55933 sogar antagonistische Effekte erzielte. Da einer der wesentlichen Unterschiede zwischen beiden Zelllinien in der Expression von funktionsfähigem p53 liegt, könnte dies eine mögliche Erklärung für die unterschiedlichen Ergebnisse liefern. Da der Funktionsverlust oder die Depletion des Tumorsuppressors p53 zu einer Beeinträchtigung des ATM-Signalweges führt, werden in diesen Zellen möglicherweise alternative Signalwege, wie jener über die Proteinkinase ATR, zur Detektion und Reparatur von DNA-Schäden essenziell (Reaper et al. 2011). Erfährt auch dieser Signalweg einen Funktionsverlust – wie zum Beispiel durch den ATR-Inhibitor VE-821 – kann die Zelle DNA-Schäden nicht mehr reparieren und stirbt im Sinne der synthetischen Letalität ab (Reaper et al. 2011).

Bekannterweise führt VE-821 zu einer Sensibilisierung von Krebszellen für DNA-schädigende Substanzen wie Gemcitabin, Camptothecin, Etoposid oder Cisplatin, wobei dieser Effekt zusätzlich potenziert wird, wenn in diesen Zellen mutiertes p53 oder eine Inaktivierung dieses Tumorsuppressors vorliegt (Reaper et al. 2011, Sangster-Guity et al. 2011).

Nach Betrachtung der beschriebenen synergistischen Wirkungen einer ATR-Inhibition in Kombination mit einer Induktion von DNA-Schäden wurde letzterer Effekt nach Behandlung beider Zelllinien mit AUY922 via Western Blot untersucht.

Es zeigten sich zunächst pH2AX-Banden, die bereits für ein hohes Maß an DNA-Schädigungen in unbehandelten A673-Zellen sprechen. Dieser Effekt ist möglicherweise auf endogenen, replikativen Stress zurückzuführen, der in A673-Zellen bereits beschrieben wurde und diese Zellen damit attraktiv für Inhibitoren des DNA-Schadensantwort-Systems wie VE-821 macht (Nieto-Soler et al. 2016).

Der DNA-Schadensantwort auf replikativen Stress ist dabei wahrscheinlich eine herausragende Bedeutung zuzumessen, da diese insbesondere durch ATR und CHK1, deren Aktivität durch VE-821 eine Inhibition erfährt, vermittelt wird (Murga et al. 2011, Weber und Ryan 2015).

Obwohl eine Depletion der Kinasen ATM, ATR und CHK1 durch HSP90-Inhibition und eine Phosphorylierung des Histon-Proteins H2AX nach Behandlung mit AUY922 in früheren Versuchen unter Verwendung von HeLa-, MCF-7-, 8505C- und CAL62-Zellen gezeigt wurden (Ha et al. 2011, Kim et al. 2015), konnten diese Effekte in dieser Arbeit nur in WE-68-Zellen erreicht werden. Da die Konzentrationen an pH2AX mit steigender Behandlungsdauer und Wirkstoffkonzentration in A673-Zellen bei einer zeitgleichen erhöhten Phosphorylierung der Kinase ATM rückläufig waren, könnte eine verminderte Phosphorylierung des Histonproteins durch eine reduzierte Funktionalität der Kinase bei gleichzeitig vorliegenden DNA-Schäden vermutet werden. Eine zweite mögliche Erklärung könnte die Abhängigkeit der Stabilität von pH2AX von phosphoryliertem HSP90 sein, welches nach Aktivierung durch PIKK's an Orten der DNA-Reparatur akkumuliert (Quanz et al. 2012).

Die Akkumulation der gespaltenen Formen von Caspase 3 und PARP, die mit steigenden Konzentrationen an AUY922 und zunehmender Behandlungsdauer in beiden Zelllinien via Western Blot nachweisbar waren, weisen auf eine proapoptotische Wirkung von AUY922 hin.

Es wäre denkbar, dass dieser proapoptotische Einfluss von AUY922 auf A673-Zellen in einer Hochregulation von NOXA begründet liegt, welches auch unabhängig von funktionsfähigem p53 den Zelltod durch Apoptose initiieren kann (Zhang et al. 2013). Leider konnten zumindest bei Kombination von AUY922 und VE-821 keine signifikanten Expressionssteigerungen von NOXA in A673-Zellen dargestellt werden.

In einer früheren Arbeit wurde eine mitochondriale Apoptose über NOXA nach HSP90-Inhibition allerdings in Zellen von Mantelzelllymphomen nachgewiesen (Jin et al. 2011), was sich unter Verwendung von AUY922 in dieser Arbeit in A673-Zellen zumindest in einem Trend der Expressionssteigerung von NOXA nachvollziehen ließ. Ferner zeigte sich eine geringe Hochregulation des proapoptotischen Genes von BIM, dessen Proteinprodukt alle antiapoptotischen Proteine der BCL-2 Familie binden und sowohl BAX als auch BAK direkt aktivieren kann (Zhang et al. 2013).

Da die transkriptionelle Induktion von BIM als ein Ergebnis des Entzuges von Wachstumsfaktoren und Zytokinen gesehen wird (Gillings et al. 2009), weist dies auf eine destabilisierende Wirkung des HSP90-Inhibitors AUY922 auf Elemente im Signalweg dieser Botenstoffe hin. Eines dieser womöglich betroffenen Elemente, welches von HSP90 abhängig ist, stellt die Kinase Akt dar, welche die Aktivität des für BIM zuständigen Transkriptionsfaktor FOXO3A inhibiert (Fu und Tindall 2008, Gillings et al. 2009, Liang et al. 2015). Die Depletion von Akt in Ewing-Sarkomzellen nach HSP90-Inhibition konnte bereits gezeigt werden (Ambati et al. 2014). Eine Hochregulation vom BIM ließ sich auch nach Kombination von AUY922 und KU-55933 in A673-Zellen erheben und stellt auch hier möglicherweise das Resultat einer Depletion von Akt dar.

Eine Inhibition von ATM durch KU-55933 führt unter anderem zur verminderten Phosphorylierung von BRCA1 bei Vorliegen von strahleninduzierten DNA-Schäden (Gatei et al. 2000, Hickson et al. 2004). Da BRCA1 eine wichtige Rolle in der Reparatur von DNA-Schäden über homologe Rekombination spielt (Gatei et al. 2000), könnte eine Inhibition in Abwesenheit von funktionstüchtigem p53 ebenfalls die Kriterien der synthetischen Letalität erfüllen und somit den beobachteten Synergismus begründen. Da insbesondere DSBs eine BRCA1-abhängige Reparatur benötigen (Cortez et al. 1999), leuchtet darüber hinaus ein Synergismus in A673-Zellen mit erhöhten Leveln an für DSBs stehendem pH2AX ein (Kuo und Yang 2008).

Da BRCA1 zudem in Ewing-Sarkomzellen aufgrund erhöhter basaler Transkriptionslevel und der damit einhergehenden Bindung des Reparaturproteins in R-Schleifen funktionelle Beeinträchtigungen aufweist, stellt dieser Aspekt einen weiteren, möglicherweise neben dem p53-Status relevanten, Hintergrund zur Etablierung einer synthetischen Letalität dar (Gorthi et al. 2018).

Es lässt sich zusammenfassend also ein p53-unabhängiger, proapoptotischer und darüber hinaus DNA-schädigender Effekt von AUY922 in A673-Zellen vermuten.

DNA-Schäden ließen sich allerdings nicht abschließend durch Akkumulation von pH2AX verifizieren. Es lässt sich daraus schließen, dass dieses möglicherweise von der stabilisierenden Wirkung von HSP90 abhängige Protein eventuell keinen geeigneten Marker für DNA-Schäden in A673-Zellen darstellt.

Die für eine Akkumulation von pH2AX sprechenden Banden bei Behandlung mit 50 nM über 24 h (s. Abb. 9) legen den Gedanken nahe, dass bei geringen Konzentrationen der destabilisierende Effekt auf pH2AX den der DNA-Schädigung überwiegt und bei weiterer Konzentrationssteigerung letzterem verhältnismäßig unterliegt.

Der beobachtete Synergismus von AUY922 mit beiden Kinaseinhibitoren in A673-Zellen stützt sich trotz diskrepanter Muster im Western Blot dennoch am ehesten auf das Prinzip der synthetischen Letalität, das hier durch die Insuffizienz mehrerer Signalwege zur DNA-Reparatur und bei zusätzlichem Vorliegen von DNA-Schäden – seien sie intrinsisch durch replikativen Stress oder extrinsisch durch den HSP90-Inhibitor entstanden – zum Tragen kommt.

In WE-68-Zellen zeigte sich im Western Blot eine im Vergleich zu A673-Zellen noch stärkere Akkumulation von gespaltener Caspase 3 als Apoptosemarker in Korrelation mit erhöhten Gesamtproteinkonzentrationen und Phosphorylierungen an p53. Möglicherweise lag diesem Effekt ebenfalls eine vermehrte Phosphorylierung und Aktivierung von ATM in WE-68-Zellen zugrunde, die hier allerdings durch den Abbau des Proteins, das als HSP90-Klient gilt, verschleiert sein könnte (Kim et al. 2015). Es konnten Hinweise für eine vermehrte Expression der Gene von CDKN1A, MDM2, PUMA und BAX nach Behandlung mit AUY922 und VE-821 gesammelt werden, was für die Induktion eines p53-abhängigen Mechanismus der Apoptose in WE-68-Zellen spricht.

Es konnte dabei keine statistische Signifikanz der Effekte auf die Genexpression von CDKN1A und MDM2 erreicht werden. Eine theoretisch vorliegende Überexpression von p21 könnte allerdings neben einer G1-Arretierung möglicherweise antiapoptotische Effekte herbeiführen, die einen denkbaren Grund für den fehlenden Synergismus von AUY922 und den beiden Kinaseinhibitoren in WE-68-Zellen liefern (Smeenk und Lohrum 2010, Zhang et al. 2013).

Die Arretierung von WE-68-Zellen am G1-Kontrollpunkt nach Anwendung geringer Konzentrationen von VE-821 (s. Abb. 7) stimmte außerdem mit der vermehrten Expression von CDKN1A nach Kombinationsbehandlung mit AUY922 und VE-821 in WE-68-Zellen überein und legt eine DNA-schädigende Wirkung beider Substanzen nahe, die sich nach Kombination vermutlich weiter verstärkt.

In Übereinstimmung mit dieser Beobachtung förderte eine Einzelbehandlung mit ATR-Inhibitoren in einer anderen Arbeit die Bildung von pH2AX in Ewing-Sarkomzellen (Nieto-Soler et al. 2016).

Die Abhängigkeit der Apoptose in WE-68-Zellen von funktionierendem p53 stellt eine mögliche Ursache für den Antagonismus dar, den AUY922 mit KU-55933 in diesen Zellen eingeht. Da die Inhibierung von ATM durch KU-55933 zu einer geringeren Phosphorylierung von p53 führt (Hickson et al. 2004), können diese Zellen möglicherweise weniger Apoptose über Zielgene von p53 wie PUMA oder NOXA betreiben, was sich in niedrigeren Expressionsniveaus dieser proapoptotischen Faktoren innerhalb der durchgeführten PCR nach Behandlung mit KU-55933 widerspiegelte. Da die Funktionalität des ATM-Signalwegs in WE-68-Zellen anscheinend nicht beeinträchtigt ist, kommt in diesen Zellen kein Synergismus zwischen AUY922 und VE-821 auf der Basis der synthetischen Letalität zustande.

AUY922 weist in der Zusammenschau der Ergebnisse das Potential auf, DNA-Schäden in WE-68-Zellen zu induzieren und Apoptose herbeizuführen. Letzterer Effekt findet in diesen Zellen allerdings am ehesten p53-abhängig statt und wird möglicherweise durch die Kinaseinhibitoren, insbesondere durch KU-55933, abgemildert.

Ein leichter synergistischer Effekt konnte zwischen AUY922 und Etoposid in beiden Zelllinien bei Verwendung der jeweils höheren Konzentration von AUY922 zur Vorinkubation gesehen werden (s. Abb. 4 und 6).

Ähnliche Effekte wurden bereits 2006 unter der Verwendung von Geldanamycin und Radiciol zur HSP90-Inhibierung in HCT116-Zellen beobachtet und auf erhöhte DNA-Schädigungen und einen möglicherweise von Topoisomerase II abhängigen Mechanismus der Apoptose zurückgeführt (Barker et al. 2006). Die Stabilität der Topoisomerase II wurde im Zuge dessen durch die Inhibierung von HSP90 nicht beeinträchtigt (Barker et al. 2006).

Eine weitere Betrachtung der Stärke der Synergismen, die Etoposid in beiden Zelllinien mit VE-821 und KU-55933 ausübt, führt zu der Mutmaßung, dass die durch Etoposid induzierten DNA-Schäden wahrscheinlich ein größeres Ausmaß annehmen als jene, die durch AUY922 verursacht wurden. Dabei konnten die früher in anderen Zelllinien beobachteten Sensibilisierungen für durch Etoposid induzierte DNA-Schäden nicht nur durch VE-821, sondern auch durch KU-55933 in beiden Zelllinien bestätigt werden (Hickson et al. 2004, Reaper et al. 2011, Korwek et al. 2012).

6.3. Sensibilisierung von Ewing-Sarkomzellen für DNA-Schäden durch Depletion von HSP90-Klientenproteinen

Fraglich bleibt, ob synergistische Effekte, die durch AUY922 hervorgerufen werden, neben der Blockade essenzieller Reparaturmechanismen durch die Kinaseinhibitoren ein bloßer Ausdruck der vermuteten DNA-schädigenden Wirkung von AUY922 sind, da die Inhibition von HSP90 konzentrationsabhängig außerdem zu einer Depletion einer Vielzahl von Klienten führt (Mahalingam et al. 2009). Zwei Beispiele für die Depletion von Klienten mit Einfluss auf DNA-Reparatur und Zellzyklusarrest finden sich in BRCA1 und CHK1 (Barker et al. 2006, Stecklein et al. 2012). Deren Depletion war nach Behandlung beider Zelllinien mit AUY922 auch in den Western Blots dieser Arbeit zu sehen. Es lässt sich deshalb die Vermutung aufstellen, dass AUY922 über die Depletion mehrerer Klienten eine genomische Instabilität und eine Sensibilisierung von Zellen für weitere Substanzen mit DNA-schädigender Wirkung in den untersuchten Zellen erreicht. Eine Unterstützung für diese These liefern Daten aus In-vitro-Versuchen unter Verwendung einer Kombination aus Geldanamycin und Gemcitabin, die eine Sensibilisierung für das genutzte Nukleosid Gemcitabin durch CHK1-Depletion und eine erhöhte Empfindlichkeit der beobachteten Zellen für replikativen Stress nahelegen (Arlander et al. 2003).

Da in A673-Zellen dieser replikative Stress anhand erhöhter basaler pH2AX-Konzentrationen zudem anscheinend in einem höheren Maß als in WE-68-Zellen vorliegt (Nieto-Soler et al. 2016), könnte auch dieser Mechanismus der Depletion verantwortlicher Elemente der DNA-Schadensantwort der Synergie von AUY922 und den Kinaseinhibitoren Rechnung tragen.

AUY922 könnte möglicherweise in A673-Zellen sogar als Einzelsubstanz eine Art synthetische Letalität aufweisen, da es nicht nur DNA-Schäden provozieren könnte, sondern auch die benötigten Reparaturmechanismen durch Depletion der entsprechenden Klienten entkräftet. Dies könnte auch eine mögliche Erklärung für die höhere Toxizität von AUY922 bei niedrigeren Konzentrationen in A673-Zellen im Vergleich zu WE-68-Zellen mit intaktem p53-Signalweg darstellen.

Ein weiterer, in diesem Zusammenhang möglicherweise relevanter Aspekt findet sich in der indirekten Beeinflussung verschiedener Klientenproteine durch Depletion von Transkriptionsfaktoren. C-Myc stellt einen solchen Transkriptionsfaktor dar, der zudem eine regulatorische Rolle in der Expression von Proteinen einnimmt, die an der Reparatur von DSB beteiligt sind (Luoto et al. 2010) und bereits in einer anderen Arbeit zum Ewing-Sarkom durch Inhibition von HSP90 depletiert werden konnte (Ambati et al. 2014). Luoto et al. konnten durch die alleinige Beeinflussung von c-Myc allerdings keine verbesserte Chemo- oder Strahlensensibilität in einer Auswahl von Tumorzelllinien generieren. Möglicherweise lässt sich aber eine erhöhte Sensibilität durch die Beeinflussung zusätzlicher Klienten mit Funktion in der DNA-Schadensantwort-Kaskade durch HSP90-Inhibition erreichen, wodurch sich eventuell auch der in dieser Arbeit beobachtete leichte Synergismus zwischen AUY922 und Etoposid in beiden Zelllinien erklären ließe.

Die Abhängigkeit der Kinasen ATM und ATR von HSP90 (Kim et al. 2015) zeigt das Potential auf, durch eine zeitgleiche Inhibition sowohl der Kinasen als auch des Chaperons, Feed-Back-Mechanismen zu unterbinden, die zu einer Resistenz gegenüber Kinaseinhibitoren führen können (Joshi et al. 2018). Präklinische Studien konnten dementsprechend bereits zeigen, dass eine simultane Behandlung von Tumorzellen mit HSP90-Inhibitoren und Kinase-Inhibitoren nicht nur die Effektivität der Behandlung verlängern, sondern auch die Toxizitäten durch geringere Wirkstoffdosen reduzieren konnte (Schwartz et al. 2015).

Dementsprechend könnten die gezeigten Synergismen zwischen AUY922 und VE-821 möglicherweise auch in einem gestörten Adaptationsmechanismus der Tumorzellen begründet liegen, der bei alleiniger Behandlung eventuell zu einer Resistenzentwicklung führt. Um dieser Vermutung nachzugehen, könnten sich weitere Experimente mit den untersuchten Wirkstoffkombinationen über einen längeren Zeitraum als sinnvoll erweisen.

6.4. Induktion einer Hitze-Schock-Reaktion in Ewing-Sarkomzellen

Die Inhibition von HSP90 ging in beiden Zelllinien abhängig von der verwendeten Konzentration von AUY922 und der Behandlungsdauer mit einer Akkumulation von HSP90 einher (Abb. 9). Dieser Effekt ist dabei am ehesten als Hitze-Schock-Reaktion zu werten, die als kompensatorischer Mechanismus abhängig von der transkriptionssteigernden Wirkung von HSF1 stattfindet und zu einer verstärkten Expression von HSP90 führt (de Billy et al. 2009).

Da innerhalb dieser Hitze-Schock-Antwort auch die Expression weiterer Hitze-Schock-Proteine wie HSP70, HSP40 und HSP27 mit kompensatorisch für den HSP90-Ausfall wirkenden Effekten gesteigert wird, könnte dies die zytotoxischen Effekte der HSP90-Inhibition durch AUY922 abmildern (Bhatia et al. 2018). Diese Vermutung geht zudem mit der Beobachtung konform, nach der die Unterbindung der Induktion von HSP70 die proapoptotische Wirkung des HSP90-Inhibitors Geldanamycin steigert (Guo et al. 2005). In diesem Zusammenhang bleibt es außerdem fraglich, ob die durch eine alleinige Anwendung von AUY922 mittels Western Blot erhobenen Effekte auf die intrazellulären Proteinkonzentrationen durch vermehrte Expression anderer Hitze-Schock-Proteine ab bestimmten Konzentrationen oder Behandlungsdauern verzerrt wurden. Hierzu könnte es von Vorteil für die Interpretation der Western Blots sein, die Konzentrationen weiterer Hitze-Schock-Proteine zu bestimmen.

Chen et al. berichteten 2014, dass die antitumorösen Effekte einer HSP90-Inhibition durch Ausschalten des Genes von HSF1 oder durch eine Inhibition seiner Genprodukte oder seines Koaktivators MLL1 durch eine ausbleibende Hitze-Schock-Reaktion deutlich gesteigert werden konnten (Chen et al. 2014b). Eine derartige Beeinflussung der Hitze-Schock-Antwort könnte also auch in Ewing-Sarkomzellen eine Steigerung der Wirksamkeit von AUY922 herbeiführen und eventuell auch die synergistischen Effekte mit VE-821, KU-55933 oder Etoposid verstärken.

Es wäre außerdem denkbar, dass durch diesen zusätzlichen Effekt auch die Proteinkonzentrationen von EWS-FLI1 beeinflusst werden können, die sich in dieser Arbeit als stabil erwiesen haben.

Da die Entwicklung neuer HSP90-Inhibitoren weiter voranschreitet, sollten auch die Effekte von AUY922 mit weiteren Stoffen dieser Substanzklasse verglichen werden.

Eine Alternative zeigen neue HSP90-Inhibitoren mit Affinität zum C-terminalen Ende des Proteins auf, die ebenfalls eine Klientendepletion verursachen, jedoch im Gegensatz zu Inhibitoren mit Affinität zum N-Terminus des Proteins zu keiner Hitze-Schock-Reaktion führen (Bhatia et al. 2018). Aktuell existieren vielversprechende Daten hierzu aus Versuchen mit Prostatakrebszellen und Zellen einer chronisch-myeloischen Leukämie (Armstrong et al. 2016, Bhatia et al. 2018).

6.5. Chaperome als potentielle therapeutische Zielstrukturen

Auch in Ewing-Sarkomzellen stellt die Bildung von Chaperomen und deren Konnektivität untereinander möglicherweise einen neuen Ansatz zur Effektivitätssteigerung der Inhibition von Hitze-Schock-Proteinen dar. Da in den bearbeiteten Zelllinien das Vorliegen von chronischem zellulärem Stress zum einen anhand des replikativen Stresses (Nieto-Soler et al. 2016) und zum anderen aufgrund erhöhter basaler Transkriptionslevel in Gegenwart von EWS-FLI1 (Gorthi et al. 2018) angenommen werden könnte, ist eine aus dem anspruchsvollen zellulären Milieu erwachsende chronische Hitze-Schock-Antwort und damit einhergehend auch die Konnektivitätssteigerung bzw. Oligomersierung von Chaperomen aus HSP90 und HSP70 denkbar (Joshi et al. 2018). Das Ausmaß der Chaperombildung entscheidet durch den Grad an Konnektivität darüber, ob entsprechend der Typ 1-Tumoren laut Joshi et al. ein Zuwachs in der Funktionalität des Proteoms stattfindet oder ob gemäß der Typ 2-Tumoren die funktionelle Redundanz zwischen Chaperomen wie dem HSP90- und dem HSP70-Chaperom erhalten bleibt (Joshi et al. 2018). Inwiefern die Chaperombildung in den untersuchten Ewing-Sarkomzellen eine Auswirkung auf die Effektivität von AUY922 und dessen Kombination mit anderen Wirkstoffen hat, ist nicht abzusehen.

Eine denkbare Möglichkeit, um die funktionelle Redundanz der Chaperome in den untersuchten Zellen im Ansatz abzubilden, könnte die Kombinationsbehandlung aus AUY922 mit einem HSP70-Inhibitor und die anschließende Messung des resultierenden Zelltodes nach einem bestimmten Zeitraum darstellen.

Bei einer Steigerung des Zelltodes nach Kombinationsbehandlung zweier HSP-Inhibitoren im Vergleich zur Einzelbehandlung könnte anschließend eine verringerte Konnektivität suggeriert werden.

Zeitgleich könnte eine solche simultane Hemmung mehrerer Chaperonsubtypen einen weiteren Ausgangspunkt für Strategien zur besseren Inhibierung von Zielstrukturen bieten.

Ein konkretes Beispiel für die funktionelle Redundanz in den HSP-Netzwerken konnte in einer anderen Arbeit durch die steigende Affinität der Kinase CDK4 unter anderem zu HSP70 nach Inhibition von HSP90 durch AUY922 gezeigt werden (Lambert et al. 2013). Die Affinitätssteigerung zu anderen Chaperonen wie HSC70 konnte für weitere Proteine – darunter hauptsächlich Kinasen – unter der Verwendung von Geldanamycin bestätigt werden (Taipale et al. 2014).

Diese Erkenntnisse stellen eine weitere Grundlage für Überlegungen zur potentiellen Effektivitätssteigerung von Kinaseinhibitoren durch multiple Inhibition von Chaperonen dar, um der Adaptation von Tumorzellen durch funktionelle Redundanz von Chaperonen entgegenzuwirken. Da es bereits klinische Bestrebungen zur Resensibilisierung von Tumorzellen auf Kinaseinhibitoren durch die Inhibition von HSP90 gibt, diese allerdings beispielsweise in einem Patientenkollektiv mit Bronchialkarzinom und ausbleibendem Therapieerfolg unter Erlotinib nur ernüchternde Ergebnisse bei höheren Toxizitäten liefern konnten, könnte die Hinzunahme weiterer HSP-Inhibitoren in derartigen Fragestellungen und nach den vorangegangenen Überlegungen eventuell erfolgversprechender sein (Johnson et al. 2015).

7. Schlussfolgerungen

Das Protein HSP90 ist für die Funktion einer Vielzahl von Klientenproteinen essenziell. Unter diesen Klienten dienen viele der Kontrolle der Proliferation, Apoptose, Differenzierung und Metastasierung (Barrott und Haystead 2013). Es wird außerdem angenommen, dass die Hochregulation von HSP90 in Tumoren unerlässlich ist, um das anspruchsvolle zelluläre Milieu zu überleben, das aus den Veränderungen hervorgeht, die zur malignen Transformation führen (Barrott und Haystead 2013). Der HSP90-Inhibitor AUY922 zeigte im Vorfeld bereits ein hohes therapeutisches Potential für eine Vielzahl an Tumoren, gemessen an den Ergebnissen bisheriger In-vitro- und In-vivo-Versuche und an durchgeführten klinischen Studien (Eccles et al. 2008, Brough et al. 2008, Tatokoro et al. 2015). In dieser Arbeit sollte die Wirksamkeit von AUY922 in Ewing-Sarkomzellen abhängig von Ihrem p53-Status evaluiert und möglicherweise bestehende synergistische Effekte mit weiteren Substanzen erforscht werden. Im Zuge dessen konnten synergistischer Effekte zwischen AUY922 und den beiden Kinaseinhibitoren VE-821 und KU-55933 in der Ewing-Sarkomzelllinie A673 mit p53-Null Status gezeigt werden. Der beobachtete zytotoxische Effekt beruhte nach Auswertung der Western Blots und Echtzeit RT-PCR dabei am ehesten auf einer direkten oder indirekten DNA-Schädigung durch AUY922 und einer sich anschließenden p53-unabhängigen, Caspase-vermittelten Apoptose.

Nach weiteren Überlegungen zum Mechanismus des bestehenden Synergismus zwischen AUY922 und den Kinaseinhibitoren in A673-Zellen könnte ebendieser zum einen das Resultat der synthetischen Letalität durch Induktion von DNA-Schäden bei gleichzeitigem Vorliegen bestehender und induzierter Defekte in der DNA-Schadensantwort sein. Eine weitere denkbare Alternative stellt die Kombination aus Destabilisierung von HSP90-Klientenproteinen mit Funktion in der DNA-Reparatur wie BRCA1 und der Blockierung der DNA-Schadensantwort durch VE-821 oder KU-55933 dar, welche möglicherweise zur Insuffizienz der zellulären DNA-Reparatur und zur Apoptose bei vorhandenem endogenem replikativem Stress führt (Nieto-Soler et al. 2016). Die Kombinationsbehandlung führte in WE-68-Zellen mit p53-Wildtyp in diesem Kontext deshalb vermutlich zu keinem Synergismus, weil diese Zellen einen intakten p53-Signalweg aufweisen und anhand des niedrigen basalen pH2AX-Gehaltes wahrscheinlich ein geringeres Maß an endogenem replikativem Stress erzeugen.

Letztlich führte die Inhibition von HSP90 neben den genannten Effekten auch zu einem Anstieg von HSP90 im Western Blot. Es wäre deshalb sinnvoll, neben dem inhibierten und damit wahrscheinlich dysfunktionalen HSP90 auch weitere Hitzeschockproteine im Western Blot mitzuführen, um das kompensatorische Ausmaß der Hitze-Schock-Antwort bewerten zu können. Auch ein Vergleich von AUY922 mit C-terminalen HSP90-Inhibitoren, die keine Induktion einer Hitze-Schock-Antwort herbeiführen, könnte in weiteren wissenschaftlichen Arbeiten die Bedeutung dieser Reaktion für antitumoröse Effekte und die Beeinträchtigung von Klientenproteinen im Rahmen einer pharmakologischen Beeinflussung von HSP90 weiter offenlegen (Bhatia et al. 2018). Zudem wäre neben der Anwendung von AUY922 eine zusätzliche Hemmung weiterer Hitze-Schock-Proteine sinnvoll, um zum einen die Hitze-Schock-Antwort nach HSP90-Inhibition zu verringern und zum anderen, um der Konnektivitätssteigerung im Rahmen der Chaperombildung entgegenzuwirken (Joshi et al. 2018). Letzteres Phänomen könnte außerdem dazu beitragen, Kollektive von Patienten zu finden, die sich für eine effektive Einzelbehandlung mit HSP90-Inhibitoren eignen.

Die Beeinträchtigung von HSP90 stellt die Methode des Western Blots vor eine besondere Herausforderung. Während die Effekte auf den zellulären Proteinhaushalt von AUY922 untersucht wurden, konnte beispielsweise p^{H2}AX als Marker für DSBs nicht abschließend interpretiert werden, da AUY922 konzentrationsabhängig nicht nur zur erhöhten Phosphorylierung, sondern möglicherweise auch zur Depletion von H2AX führt. Die Darstellung von DNA-Schäden nach Behandlung mit AUY922 sollte deshalb mit weiteren Methoden vollzogen werden. Da das Ewing-Sarkom als Systemerkrankung eine frühe Metastasierung aufweist, könnten immunopräzipitatorisch auch Faktoren wie HIF1A und MMP2 analysiert werden, die im Zusammenhang mit der Bildung von Filiae stehen.

Abschließend sprechen die Daten aus den dargestellten In-vitro-Experimenten für HSP90 als vielversprechende Zielstruktur für zukünftige Systemtherapien des Ewing-Sarkoms. Dies gilt besonders in Bezug auf das mit einer schlechten Prognose einhergehende Ewing-Sarkom mit p53-Null Status (Neilsen et al. 2011). Diese Dissertation bildet somit eine Grundlage für weiterführende In-vitro- und In-vivo-Forschung an den diskutierten Themenfeldern unter Verwendung des HSP90-Inhibitors AUY922 in Ewing-Sarkomzellen.

8. Literaturverzeichnis

- Abbaspour Babaei M, Kamalidehghan B, Saleem M, Huri HZ, Ahmadipour F. 2016. Receptor tyrosine kinase (c-Kit) inhibitors: a potential therapeutic target in cancer cells. *Drug Des Devel Ther*, 10:2443-2459.
- Amaral JD, Xavier JM, Steer CJ, Rodrigues CM. 2010. The role of p53 in apoptosis. *Discov Med*, 9 (45):145-152.
- Ambati SR, Lopes EC, Kosugi K, Mony U, Zehir A, Shah SK, Taldone T, Moreira AL, Meyers PA, Chiosis G, Moore MA. 2014. Pre-clinical efficacy of PU-H71, a novel HSP90 inhibitor, alone and in combination with bortezomib in Ewing sarcoma. *Mol Oncol*, 8 (2):323-336.
- Anckar J, Sistonen L. 2011. Regulation of HSF1 function in the heat stress response: implications in aging and disease. *Annu Rev Biochem*, 80:1089-1115.
- Arlander SJ, Eapen AK, Vroman BT, McDonald RJ, Toft DO, Karnitz LM. 2003. Hsp90 inhibition depletes Chk1 and sensitizes tumor cells to replication stress. *J Biol Chem*, 278 (52):52572-52577.
- Armstrong HK, Koay YC, Irani S, Das R, Nassar ZD, Australian Prostate Cancer B, Selth LA, Centenera MM, McAlpine SR, Butler LM. 2016. A Novel Class of Hsp90 C-Terminal Modulators Have Pre-Clinical Efficacy in Prostate Tumor Cells Without Induction of a Heat Shock Response. *Prostate*, 76 (16):1546-1559.
- Bagatell R, Beliakoff J, David CL, Marron MT, Whitesell L. 2005. Hsp90 inhibitors deplete key anti-apoptotic proteins in pediatric solid tumor cells and demonstrate synergistic anticancer activity with cisplatin. *Int J Cancer*, 113 (2):179-188.
- Bano D, Prehn JHM. 2018. Apoptosis-Inducing Factor (AIF) in Physiology and Disease: The Tale of a Repented Natural Born Killer. *EBioMedicine*, 30:29-37.
- Barker CR, McNamara AV, Rackstraw SA, Nelson DE, White MR, Watson AJ, Jenkins JR. 2006. Inhibition of Hsp90 acts synergistically with topoisomerase II poisons to increase the apoptotic killing of cells due to an increase in topoisomerase II mediated DNA damage. *Nucleic Acids Res*, 34 (4):1148-1157.
- Barrott JJ, Haystead TA. 2013. Hsp90, an unlikely ally in the war on cancer. *FEBS J*, 280 (6):1381-1396.

- Bhatia S, Diedrich D, Frieg B, Ahlert H, Stein S, Bopp B, Lang F, Zang T, Kroger T, Ernst T, Kogler G, Krieg A, Ludeke S, Kunkel H, Rodrigues Moita AJ, Kassack MU, Marquardt V, Opitz FV, Oldenburg M, Remke M, Babor F, Grez M, Hochhaus A, Borkhardt A, Groth G, Nagel-Steger L, Jose J, Kurz T, Gohlke H, Hansen FK, Hauer J. 2018. Targeting HSP90 dimerization via the C terminus is effective in imatinib-resistant CML and lacks the heat shock response. *Blood*, 132 (3):307-320.
- Blackford AN, Jackson SP. 2017. ATM, ATR, and DNA-PK: The Trinity at the Heart of the DNA Damage Response. *Mol Cell*, 66 (6):801-817.
- Bolling T, Harges J, Dirksen U. 2013. Management of bone tumours in paediatric oncology. *Clin Oncol (R Coll Radiol)*, 25 (1):19-26.
- Boulares AH, Yakovlev AG, Ivanova V, Stoica BA, Wang G, Iyer S, Smulson M. 1999. Role of poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) cleavage in apoptosis. Caspase 3-resistant PARP mutant increases rates of apoptosis in transfected cells. *J Biol Chem*, 274 (33):22932-22940.
- Bourdon JC, Laurenzi VD, Melino G, Lane D. 2003. p53: 25 years of research and more questions to answer. *Cell Death Differ*, 10 (4):397-399.
- Brough PA, Aherne W, Barril X, Borgognoni J, Boxall K, Cansfield JE, Cheung KM, Collins I, Davies NG, Drysdale MJ, Dymock B, Eccles SA, Finch H, Fink A, Hayes A, Howes R, Hubbard RE, James K, Jordan AM, Lockie A, Martins V, Massey A, Matthews TP, McDonald E, Northfield CJ, Pearl LH, Prodromou C, Ray S, Raynaud FI, Roughley SD, Sharp SY, Surgenor A, Walmsley DL, Webb P, Wood M, Workman P, Wright L. 2008. 4,5-diarylisoazole Hsp90 chaperone inhibitors: potential therapeutic agents for the treatment of cancer. *J Med Chem*, 51 (2):196-218.
- Chen BJ, Wu YL, Tanaka Y, Zhang W. 2014a. Small molecules targeting c-Myc oncogene: promising anti-cancer therapeutics. *Int J Biol Sci*, 10 (10):1084-1096.
- Chen Y, Chen J, Yu J, Yang G, Temple E, Harbinski F, Gao H, Wilson C, Pagliarini R, Zhou W. 2014b. Identification of mixed lineage leukemia 1 (MLL1) protein as a coactivator of heat shock factor 1 (HSF1) protein in response to heat shock protein 90 (HSP90) inhibition. *J Biol Chem*, 289 (27):18914-18927.
- Chou TC. 2006. Theoretical basis, experimental design, and computerized simulation of synergism and antagonism in drug combination studies. *Pharmacol Rev*, 58 (3):621-681.
- Chou TC. 2010. Drug combination studies and their synergy quantification using the Chou-Talalay method. *Cancer Res*, 70 (2):440-446.
- Correia C, Lee SH, Meng XW, Vincelette ND, Knorr KL, Ding H, Nowakowski GS, Dai H, Kaufmann SH. 2015. Emerging understanding of Bcl-2 biology: Implications for neoplastic progression and treatment. *Biochim Biophys Acta*, 1853 (7):1658-1671.

- Cortez D, Wang Y, Qin J, Elledge SJ. 1999. Requirement of ATM-dependent phosphorylation of brca1 in the DNA damage response to double-strand breaks. *Science*, 286 (5442):1162-1166.
- de Billy E, Powers MV, Smith JR, Workman P. 2009. Drugging the heat shock factor 1 pathway: exploitation of the critical cancer cell dependence on the guardian of the proteome. *Cell Cycle*, 8 (23):3806-3808.
- DeBoer C, Meulman PA, Wnuk RJ, Peterson DH. 1970. Geldanamycin, a new antibiotic. *J Antibiot (Tokyo)*, 23 (9):442-447.
- Delmotte P, Delmotte-Plaque J. 1953. A new antifungal substance of fungal origin. *Nature*, 171 (4347):344.
- Dirksen U, Brodowicz T, Hummel Y, Jürgens H, Reichardt P, Schütte J. 2012. Ewing-Sarkom Leitlinie. <https://www.onkopedia.com/de/onkopedia/guidelines/ewing-sarkom/@@view/pdf/index.pdf?filename=ewing-sarkom.pdf>, letzter Zugriff am 20.06.2019
- Dirksen U, Jürgens H. 2014. S1-Leitlinie: Ewing-Sarkome des Kindes- und Jugendalters [Leitlinie]. AWMF online. https://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/025-006l_S1_Ewing_Sarkome_Kinder_Jugendliche_2014-06-abgelaufen.pdf, letzter Zugriff am 19.08.2019.
- Duchman KR, Gao Y, Miller BJ. 2015. Prognostic factors for survival in patients with Ewing's sarcoma using the surveillance, epidemiology, and end results (SEER) program database. *Cancer Epidemiol*, 39 (2):189-195.
- Eccles SA, Massey A, Raynaud FI, Sharp SY, Box G, Valenti M, Patterson L, de Haven Brandon A, Gowan S, Boxall F, Aherne W, Rowlands M, Hayes A, Martins V, Urban F, Boxall K, Prodromou C, Pearl L, James K, Matthews TP, Cheung KM, Kalusa A, Jones K, McDonald E, Barril X, Brough PA, Cansfield JE, Dymock B, Drysdale MJ, Finch H, Howes R, Hubbard RE, Surgenor A, Webb P, Wood M, Wright L, Workman P. 2008. NVP-AUY922: a novel heat shock protein 90 inhibitor active against xenograft tumor growth, angiogenesis, and metastasis. *Cancer Res*, 68 (8):2850-2860.
- Echeverria PC, Bernthaler A, Dupuis P, Mayer B, Picard D. 2011. An interaction network predicted from public data as a discovery tool: application to the Hsp90 molecular chaperone machine. *PLoS One*, 6 (10):e26044.
- Elmore S. 2007. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol*, 35 (4):495-516.

- Eustace BK, Sakurai T, Stewart JK, Yimlamai D, Unger C, Zehetmeier C, Lain B, Torella C, Henning SW, Beste G, Scroggins BT, Neckers L, Ilag LL, Jay DG. 2004. Functional proteomic screens reveal an essential extracellular role for hsp90 alpha in cancer cell invasiveness. *Nat Cell Biol*, 6 (6):507-514.
- Ferreira AJ, Boldrini E, Lopez RVM, Scapulatempo Neto C, Santos JFC, Lopes LF. 2017. Characterization, survival analysis, and expression of IGFR in tumor samples from patients diagnosed with Ewing family tumors treated at the Barretos Cancer Hospital. *Rev Bras Ortop*, 52 (6):705-713.
- Freed-Pastor WA, Prives C. 2012. Mutant p53: one name, many proteins. *Genes Dev*, 26 (12):1268-1286.
- Fu Z, Tindall DJ. 2008. FOXOs, cancer and regulation of apoptosis. *Oncogene*, 27 (16):2312-2319.
- Gaspar N, Hawkins DS, Dirksen U, Lewis IJ, Ferrari S, Le Deley MC, Kovar H, Grimer R, Whelan J, Claude L, Delattre O, Paulussen M, Picci P, Sundby Hall K, van den Berg H, Ladenstein R, Michon J, Hjorth L, Judson I, Luksch R, Bernstein ML, Marec-Berard P, Brennan B, Craft AW, Womer RB, Juergens H, Oberlin O. 2015. Ewing Sarcoma: Current Management and Future Approaches Through Collaboration. *J Clin Oncol*, 33 (27):3036-3046.
- Gatei M, Scott SP, Filippovitch I, Soronika N, Lavin MF, Weber B, Khanna KK. 2000. Role for ATM in DNA damage-induced phosphorylation of BRCA1. *Cancer Res*, 60 (12):3299-3304.
- Gillings AS, Balmanno K, Wiggins CM, Johnson M, Cook SJ. 2009. Apoptosis and autophagy: BIM as a mediator of tumour cell death in response to oncogene-targeted therapeutics. *FEBS J*, 276 (21):6050-6062.
- Gorthi A, Romero JC, Loranc E, Cao L, Lawrence LA, Goodale E, Iniguez AB, Bernard X, Masamsetti VP, Roston S, Lawlor ER, Toretsky JA, Stegmaier K, Lessnick SL, Chen Y, Bishop AJR. 2018. EWS-FLI1 increases transcription to cause R-loops and block BRCA1 repair in Ewing sarcoma. *Nature*.
- Guo F, Rocha K, Bali P, Pranpat M, Fiskus W, Boyapalle S, Kumaraswamy S, Balasis M, Greedy B, Armitage ES, Lawrence N, Bhalla K. 2005. Abrogation of heat shock protein 70 induction as a strategy to increase antileukemia activity of heat shock protein 90 inhibitor 17-allylamino-demethoxy geldanamycin. *Cancer Res*, 65 (22):10536-10544.
- Ha K, Fiskus W, Rao R, Balusu R, Venkannagari S, Nalabothula NR, Bhalla KN. 2011. Hsp90 inhibitor-mediated disruption of chaperone association of ATR with hsp90 sensitizes cancer cells to DNA damage. *Mol Cancer Ther*, 10 (7):1194-1206.
- Halazonetis TD, Gorgoulis VG, Bartek J. 2008. An oncogene-induced DNA damage model for cancer development. *Science*, 319 (5868):1352-1355.

- Hanahan D, Weinberg RA. 2000. The hallmarks of cancer. *Cell*, 100 (1):57-70.
- Hanahan D, Weinberg RA. 2011. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144 (5):646-674.
- Hande KR. 1998. Etoposide: four decades of development of a topoisomerase II inhibitor. *Eur J Cancer*, 34 (10):1514-1521.
- Heske CM, Mendoza A, Edessa LD, Baumgart JT, Lee S, Trepel J, Proia DA, Neckers L, Helman LJ. 2016. STA-8666, a novel HSP90 inhibitor/SN-38 drug conjugate, causes complete tumor regression in preclinical mouse models of pediatric sarcoma. *Oncotarget*, 7 (40):65540-65552.
- Hickson I, Zhao Y, Richardson CJ, Green SJ, Martin NM, Orr AI, Reaper PM, Jackson SP, Curtin NJ, Smith GC. 2004. Identification and characterization of a novel and specific inhibitor of the ataxia-telangiectasia mutated kinase ATM. *Cancer Res*, 64 (24):9152-9159.
- Jin L, Tabe Y, Kimura S, Zhou Y, Kuroda J, Asou H, Inaba T, Konopleva M, Andreeff M, Miida T. 2011. Antiproliferative and proapoptotic activity of GUT-70 mediated through potent inhibition of Hsp90 in mantle cell lymphoma. *Br J Cancer*, 104 (1):91-100.
- Johnson ML, Yu HA, Hart EM, Weitner BB, Rademaker AW, Patel JD, Kris MG, Riely GJ. 2015. Phase I/II Study of HSP90 Inhibitor AUY922 and Erlotinib for EGFR-Mutant Lung Cancer With Acquired Resistance to Epidermal Growth Factor Receptor Tyrosine Kinase Inhibitors. *J Clin Oncol*, 33 (15):1666-1673.
- Joshi S, Wang T, Araujo TLS, Sharma S, Brodsky JL, Chiosis G. 2018. Adapting to stress - chaperome networks in cancer. *Nat Rev Cancer*, 18 (9):562-575.
- Kauer M, Ban J, Kofler R, Walker B, Davis S, Meltzer P, Kovar H. 2009. A molecular function map of Ewing's sarcoma. *PLoS One*, 4 (4):e5415.
- Khoury JD. 2005. Ewing sarcoma family of tumors. *Adv Anat Pathol*, 12 (4):212-220.
- Kim SH, Kang JG, Kim CS, Ihm SH, Choi MG, Yoo HJ, Lee SJ. 2015. Novel heat shock protein 90 inhibitor NVP-AUY922 synergizes with the histone deacetylase inhibitor PXD101 in induction of death of anaplastic thyroid carcinoma cells. *J Clin Endocrinol Metab*, 100 (2):E253-261.
- Korwek Z, Sewastianik T, Bielak-Zmijewska A, Mosieniak G, Alster O, Moreno-Villanueva M, Burkle A, Sikora E. 2012. Inhibition of ATM blocks the etoposide-induced DNA damage response and apoptosis of resting human T cells. *DNA Repair (Amst)*, 11 (11):864-873.
- Kuo LJ, Yang LX. 2008. Gamma-H2AX - a novel biomarker for DNA double-strand breaks. *In Vivo*, 22 (3):305-309.

- Lambert JP, Ivosev G, Couzens AL, Larsen B, Taipale M, Lin ZY, Zhong Q, Lindquist S, Vidal M, Aebersold R, Pawson T, Bonner R, Tate S, Gingras AC. 2013. Mapping differential interactomes by affinity purification coupled with data-independent mass spectrometry acquisition. *Nat Methods*, 10 (12):1239-1245.
- Landuzzi L, De Giovanni C, Nicoletti G, Rossi I, Ricci C, Astolfi A, Scopece L, Scotlandi K, Serra M, Bagnara GP, Nanni P, Lollini PL. 2000. The metastatic ability of Ewing's sarcoma cells is modulated by stem cell factor and by its receptor c-kit. *Am J Pathol*, 157 (6):2123-2131.
- Lavin MF. 2008. Ataxia-telangiectasia: from a rare disorder to a paradigm for cell signalling and cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 9 (10):759-769.
- Lesko E, Gozdzik J, Kijowski J, Jenner B, Wiecha O, Majka M. 2007. HSP90 antagonist, geldanamycin, inhibits proliferation, induces apoptosis and blocks migration of rhabdomyosarcoma cells in vitro and seeding into bone marrow in vivo. *Anticancer Drugs*, 18 (10):1173-1181.
- Lessnick SL, Ladanyi M. 2012. Molecular pathogenesis of Ewing sarcoma: new therapeutic and transcriptional targets. *Annu Rev Pathol*, 7:145-159.
- Liang W, Miao S, Zhang B, He S, Shou C, Manivel P, Krishna R, Chen Y, Shi YE. 2015. Synuclein gamma protects Akt and mTOR and renders tumor resistance to Hsp90 disruption. *Oncogene*, 34 (18):2398-2405.
- Lin TY, Bear M, Du Z, Foley KP, Ying W, Barsoum J, London C. 2008. The novel HSP90 inhibitor STA-9090 exhibits activity against Kit-dependent and -independent malignant mast cell tumors. *Exp Hematol*, 36 (10):1266-1277.
- Luoto KR, Meng AX, Wasylishen AR, Zhao H, Coackley CL, Penn LZ, Bristow RG. 2010. Tumor cell kill by c-MYC depletion: role of MYC-regulated genes that control DNA double-strand break repair. *Cancer Res*, 70 (21):8748-8759.
- Mahalingam D, Swords R, Carew JS, Nawrocki ST, Bhalla K, Giles FJ. 2009. Targeting HSP90 for cancer therapy. *Br J Cancer*, 100 (10):1523-1529.
- Marechal A, Zou L. 2013. DNA damage sensing by the ATM and ATR kinases. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 5 (9).
- Martins AS, Ordonez JL, Garcia-Sanchez A, Herrero D, Sevillano V, Osuna D, Mackintosh C, Caballero G, Otero AP, Poremba C, Madoz-Gurpide J, de Alava E. 2008. A pivotal role for heat shock protein 90 in Ewing sarcoma resistance to anti-insulin-like growth factor 1 receptor treatment: in vitro and in vivo study. *Cancer Res*, 68 (15):6260-6270.

- Massey AJ, Williamson DS, Browne H, Murray JB, Dokurno P, Shaw T, Macias AT, Daniels Z, Geoffroy S, Dopson M, Lavan P, Matassova N, Francis GL, Graham CJ, Parsons R, Wang Y, Padfield A, Comer M, Drysdale MJ, Wood M. 2010. A novel, small molecule inhibitor of Hsc70/Hsp70 potentiates Hsp90 inhibitor induced apoptosis in HCT116 colon carcinoma cells. *Cancer Chemother Pharmacol*, 66 (3):535-545.
- Mazaira GI, Daneri-Becerra C, Zgajnar NR, Lotufo CM, Galigniana MD. 2017. Gene expression regulation by heat-shock proteins: the cardinal roles of HSF1 and Hsp90. *Biochem Soc Trans*.
- McCleese JK, Bear MD, Fossey SL, Mihalek RM, Foley KP, Ying W, Barsoum J, London CA. 2009. The novel HSP90 inhibitor STA-1474 exhibits biologic activity against osteosarcoma cell lines. *Int J Cancer*, 125 (12):2792-2801.
- Miyata Y, Nakamoto H, Neckers L. 2013. The therapeutic target Hsp90 and cancer hallmarks. *Curr Pharm Des*, 19 (3):347-365.
- Montecucco A, Zanetta F, Biamonti G. 2015. Molecular mechanisms of etoposide. *EXCLI J*, 14:95-108.
- Morales J, Li L, Fattah FJ, Dong Y, Bey EA, Patel M, Gao J, Boothman DA. 2014. Review of poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) mechanisms of action and rationale for targeting in cancer and other diseases. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*, 24 (1):15-28.
- Mori M, Hitora T, Nakamura O, Yamagami Y, Horie R, Nishimura H, Yamamoto T. 2015. Hsp90 inhibitor induces autophagy and apoptosis in osteosarcoma cells. *Int J Oncol*, 46 (1):47-54.
- Moulick K, Ahn JH, Zong H, Rodina A, Cerchietti L, Gomes DaGama EM, Caldas-Lopes E, Beebe K, Perna F, Hatzi K, Vu LP, Zhao X, Zatorska D, Taldone T, Smith-Jones P, Alpaugh M, Gross SS, Pillarsetty N, Ku T, Lewis JS, Larson SM, Levine R, Erdjument-Bromage H, Guzman ML, Nimer SD, Melnick A, Neckers L, Chiosis G. 2011. Affinity-based proteomics reveal cancer-specific networks coordinated by Hsp90. *Nat Chem Biol*, 7 (11):818-826.
- Murga M, Campaner S, Lopez-Contreras AJ, Toledo LI, Soria R, Montana MF, Artista L, Schleker T, Guerra C, Garcia E, Barbacid M, Hidalgo M, Amati B, Fernandez-Capetillo O. 2011. Exploiting oncogene-induced replicative stress for the selective killing of Myc-driven tumors. *Nat Struct Mol Biol*, 18 (12):1331-1335.
- Neilsen PM, Pishas KI, Callen DF, Thomas DM. 2011. Targeting the p53 Pathway in Ewing Sarcoma. *Sarcoma*, 2011:746939.
- Nieto-Soler M, Morgado-Palacin I, Lafarga V, Lecona E, Murga M, Callen E, Azorin D, Alonso J, Lopez-Contreras AJ, Nussenzweig A, Fernandez-Capetillo O. 2016. Efficacy of ATR inhibitors as single agents in Ewing sarcoma. *Oncotarget*, 7 (37):58759-58767.

- Ozaki T. 2015. Diagnosis and treatment of Ewing sarcoma of the bone: a review article. *J Orthop Sci*, 20 (2):250-263.
- Pappo AS, Dirksen U. 2018. Rhabdomyosarcoma, Ewing Sarcoma, and Other Round Cell Sarcomas. *J Clin Oncol*, 36 (2):168-179.
- Pesetto ZY, Chen B, Alturkmani H, Hyter S, Flynn CA, Baltezar M, Ma Y, Rosenthal HG, Neville KA, Weir SJ, Butte AJ, Godwin AK. 2017. In silico and in vitro drug screening identifies new therapeutic approaches for Ewing sarcoma. *Oncotarget*, 8 (3):4079-4095.
- Poole CJ, Zheng W, Lee H, Young D, Lodh A, Chadli A, van Riggelen J. 2018. Targeting the MYC Oncogene in Burkitt Lymphoma through HSP90 Inhibition. *Cancers (Basel)*, 10 (11).
- Prodromou C. 2017. Regulatory Mechanisms of Hsp90. *Biochem Mol Biol J*, 3 (1):2.
- Quanz M, Herbette A, Sayarath M, de Koning L, Dubois T, Sun JS, Dutreix M. 2012. Heat shock protein 90alpha (Hsp90alpha) is phosphorylated in response to DNA damage and accumulates in repair foci. *J Biol Chem*, 287 (12):8803-8815.
- Reaper PM, Griffiths MR, Long JM, Charrier JD, McCormick S, Charlton PA, Golec JM, Pollard JR. 2011. Selective killing of ATM- or p53-deficient cancer cells through inhibition of ATR. *Nat Chem Biol*, 7 (7):428-430.
- Regan PL, Jacobs J, Wang G, Torres J, Edo R, Friedmann J, Tang XX. 2011. Hsp90 inhibition increases p53 expression and destabilizes MYCN and MYC in neuroblastoma. *Int J Oncol*, 38 (1):105-112.
- Roe SM, Prodromou C, O'Brien R, Ladbury JE, Piper PW, Pearl LH. 1999. Structural basis for inhibition of the Hsp90 molecular chaperone by the antitumor antibiotics radicicol and geldanamycin. *J Med Chem*, 42 (2):260-266.
- Rogakou EP, Pilch DR, Orr AH, Ivanova VS, Bonner WM. 1998. DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. *J Biol Chem*, 273 (10):5858-5868.
- Saelens X, Festjens N, Vande Walle L, van Gurp M, van Loo G, Vandenabeele P. 2004. Toxic proteins released from mitochondria in cell death. *Oncogene*, 23 (16):2861-2874.
- Saldivar JC, Cortez D, Cimprich KA. 2017. The essential kinase ATR: ensuring faithful duplication of a challenging genome. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 18 (10):622-636.
- Sangster-Guity N, Conrad BH, Papadopoulos N, Bunz F. 2011. ATR mediates cisplatin resistance in a p53 genotype-specific manner. *Oncogene*, 30 (22):2526-2533.
- Schmittgen TD, Livak KJ. 2008. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat Protoc*, 3 (6):1101-1108.

- Schopf FH, Biebl MM, Buchner J. 2017. The HSP90 chaperone machinery. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 18 (6):345-360.
- Schwartz H, Scroggins B, Zuehlke A, Kijima T, Beebe K, Mishra A, Neckers L, Prince T. 2015. Combined HSP90 and kinase inhibitor therapy: Insights from The Cancer Genome Atlas. *Cell Stress Chaperones*, 20 (5):729-741.
- Sessa C, Shapiro GI, Bhalla KN, Britten C, Jacks KS, Mita M, Papadimitrakopoulou V, Pluard T, Samuel TA, Akimov M, Quadts C, Fernandez-Ibarra C, Lu H, Bailey S, Chica S, Banerji U. 2013. First-in-human phase I dose-escalation study of the HSP90 inhibitor AUY922 in patients with advanced solid tumors. *Clin Cancer Res*, 19 (13):3671-3680.
- Sidera K, Patsavoudi E. 2014. HSP90 inhibitors: current development and potential in cancer therapy. *Recent Pat Anticancer Drug Discov*, 9 (1):1-20.
- Slee EA, Adrain C, Martin SJ. 2001. Executioner caspase-3, -6, and -7 perform distinct, non-redundant roles during the demolition phase of apoptosis. *J Biol Chem*, 276 (10):7320-7326.
- Smeenk L, Lohrum M. 2010. Behind the scenes: unravelling the molecular mechanisms of p53 target gene selectivity (Review). *Int J Oncol*, 37 (5):1061-1070.
- Stecklein SR, Kumaraswamy E, Behbod F, Wang W, Chaguturu V, Harlan-Williams LM, Jensen RA. 2012. BRCA1 and HSP90 cooperate in homologous and non-homologous DNA double-strand-break repair and G2/M checkpoint activation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109 (34):13650-13655.
- Stewart E, Goshorn R, Bradley C, Griffiths LM, Benavente C, Twarog NR, Miller GM, Caufield W, Freeman BB, 3rd, Bahrami A, Pappo A, Wu J, Loh A, Karlstrom A, Calabrese C, Gordon B, Tsurkan L, Hatfield MJ, Potter PM, Snyder SE, Thiagarajan S, Shirinifard A, Sablauer A, Shelat AA, Dyer MA. 2014. Targeting the DNA repair pathway in Ewing sarcoma. *Cell Rep*, 9 (3):829-841.
- Stingl L, Niewidok N, Muller N, Selle M, Djuzenova CS, Flentje M. 2012. Radiosensitizing effect of the novel Hsp90 inhibitor NVP-AUY922 in human tumour cell lines silenced for Hsp90alpha. *Strahlenther Onkol*, 188 (6):507-515.
- Taipale M, Krykbaeva I, Koeva M, Kayatekin C, Westover KD, Karras GI, Lindquist S. 2012. Quantitative analysis of HSP90-client interactions reveals principles of substrate recognition. *Cell*, 150 (5):987-1001.
- Taipale M, Tucker G, Peng J, Krykbaeva I, Lin ZY, Larsen B, Choi H, Berger B, Gingras AC, Lindquist S. 2014. A quantitative chaperone interaction network reveals the architecture of cellular protein homeostasis pathways. *Cell*, 158 (2):434-448.
- Tatokoro M, Koga F, Yoshida S, Kihara K. 2015. Heat shock protein 90 targeting therapy: state of the art and future perspective. *EXCLI J*, 14:48-58.

- Tsai CL, Chao A, Jung SM, Tsai CN, Lin CY, Chen SH, Sue SC, Wang TH, Wang HS, Lai CH. 2016. Stress-induced phosphoprotein-1 maintains the stability of JAK2 in cancer cells. *Oncotarget*, 7 (31):50548-50563.
- Weber AM, Ryan AJ. 2015. ATM and ATR as therapeutic targets in cancer. *Pharmacol Ther*, 149:124-138.
- Westhoff MA, Marschall N, Grunert M, Karpel-Massler G, Burdach S, Debatin KM. 2018. Cell death-based treatment of childhood cancer. *Cell Death Dis*, 9 (2):116.
- Whitesell L, Lin NU. 2012. HSP90 as a platform for the assembly of more effective cancer chemotherapy. *Biochim Biophys Acta*, 1823 (3):756-766.
- Xu W, Neckers L. 2007. Targeting the molecular chaperone heat shock protein 90 provides a multifaceted effect on diverse cell signaling pathways of cancer cells. *Clin Cancer Res*, 13 (6):1625-1629.
- Zaidi S, McLaughlin M, Bhide SA, Eccles SA, Workman P, Nutting CM, Huddart RA, Harrington KJ. 2012. The HSP90 inhibitor NVP-AUY922 radiosensitizes by abrogation of homologous recombination resulting in mitotic entry with unresolved DNA damage. *PLoS One*, 7 (4):e35436.
- Zhang LN, Li JY, Xu W. 2013. A review of the role of Puma, Noxa and Bim in the tumorigenesis, therapy and drug resistance of chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Gene Ther*, 20 (1):1-7.
- Zong H, Gozman A, Caldas-Lopes E, Taldone T, Sturgill E, Brennan S, Ochiana SO, Gomes-DaGama EM, Sen S, Rodina A, Koren J, 3rd, Becker MW, Rudin CM, Melnick A, Levine RL, Roboz GJ, Nimer SD, Chiosis G, Guzman ML. 2015. A Hyperactive Signalosome in Acute Myeloid Leukemia Drives Addiction to a Tumor-Specific Hsp90 Species. *Cell Rep*, 13 (10):2159-2173.

9. Anhang

9.1. Abbildungsverzeichnis

- Abb. 1: Dotplots und Histogramme zur Auswertung der FACS-Analysen beispielhaft für eine Nullprobe der Zelllinie A673
- Abb. 2: Profil des Histogramms in der Zellzyklusanalyse
- Abb. 3: Auswirkung von AUY922 auf Zelltod und Verlust des $\Delta\Psi_m$ in A673-Zellen bei Vorbehandlung mit VE-821 oder KU-55933
- Abb. 4: Auswirkung von Etoposid auf Zelltod und Verlust des $\Delta\Psi_m$ in A673-Zellen bei Vorbehandlung mit AUY922, VE-821 oder KU-55933
- Abb. 5: Auswirkung von AUY922 auf Zelltod und Verlust des $\Delta\Psi_m$ in WE-68-Zellen bei Vorbehandlung mit VE-821 oder KU-55933
- Abb. 6: Auswirkung von Etoposid auf Zelltod und Verlust des $\Delta\Psi_m$ in WE-68-Zellen bei Vorbehandlung mit AUY922, VE-821 oder KU-55933
- Abb. 7: Auswirkungen der getesteten Inhibitoren auf den Zellzyklus von A673-Zellen und WE-68-Zellen
- Abb. 8: Beeinflussung intrazellulärer Proteinkonzentrationen und -phosphorylierungen in A673- und WE-68-Zellen
- Abb. 9: Beeinflussung intrazellulärer Proteinkonzentrationen und -phosphorylierungen in A673- und WE-68-Zellen
- Abb. 10: Genexpression von BAX in A673-Zellen und WE-68-Zellen
- Abb. 11: Genexpression von BIM in A673-Zellen und WE-68-Zellen
- Abb. 12: Genexpression von NOXA in A673-Zellen und WE-68-Zellen
- Abb. 13: Genexpression von PUMA in A673-Zellen und WE-68-Zellen
- Abb. 14: Genexpression von TP53 und MDM2 in WE-68-Zellen
- Abb. 15: Genexpression von CDKN1A in A673-Zellen und WE-68-Zellen

9.2. Tabellenverzeichnis

Tab. 1:	Konzentrationen für die Vorbehandlung mit VE-821 und KU-55933 und die Behandlung mit AUY922
Tab. 2:	Konzentrationen für die Vorbehandlung mit AUY922, VE-821 und KU-55933 und die Behandlung mit dem Zytostatikum Etoposid
Tab. 3:	Bestandteile und deren Anteile an den verwendeten Trenngelen
Tab. 4:	Bestandteile und deren Anteile am verwendeten Sammelgel
Tab. 5:	Konzentrationen der innerhalb der Experimente zur Zellzyklusanalyse verwendeten Substanzen
Tab. 6:	Innerhalb der Experimente zur Genexpressionsanalyse verwendete Konzentrationen der Wirkstoffe
Tab. 7:	CI-Werte für die Zelltodmessung nach Kombinationsbehandlung der A673-Zelllinie mit AUY922, VE-821 und KU-55933
Tab. 8:	CI-Werte für die Zelltodmessung nach Kombinationsbehandlung der A673-Zelllinie mit Etoposid, AUY922, VE-821 und KU-55933
Tab. 9:	CI-Werte für die Zelltodmessung nach Kombinationsbehandlung der WE-68-Zelllinie mit AUY922, VE-821 und KU-55933
Tab. 10:	CI-Werte für die Zelltodmessung nach Kombinationsbehandlung der WE-68-Zelllinie mit Etoposid, AUY922, VE-821 und KU-55933

9.3. Danksagung

Ich möchte mich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. med. James F. Beck bedanken, der mir die Möglichkeit gegeben hat, dieses faszinierende Thema zu bearbeiten und mich in den regelmäßigen Forschungsbesprechungen umfassend beraten und unterstützt hat.

Mein tiefer Dank gilt Dr. Jürgen Sonnemann für die unermüdliche und umfassende Betreuung während meiner Promotion. Danke für die kontinuierliche Motivation, die vielen Einblicke in die zugrundeliegende Theorie der Arbeit und die Unterstützung in Form des Korrekturlesens. Die Teilnahme zum 15. Tag der Nachwuchswissenschaftler des Forschungszentrums Lobeda und der durch die Präsentation des Themas erworbene Posterpreis in der Kategorie „medizinische Doktoranden“ bauen letztlich auch auf seiner Ermutigung dazu auf. Vielen Dank auch hierfür!

Des Weiteren möchte ich Dr. Christian Marx vom Fritz-Lippmann-Institut in Jena für die Betreuung während eines Praktikums zur Anfertigung der Western Blots, die zur Verfügung gestellten Materialien und die inhaltlichen Anregungen danken.

Bedanken möchte ich mich auch bei Sabine Becker für Ihre Empfehlungen und Ratschläge während der Durchführung meiner Experimente, sowie für das angenehme und freundschaftliche Arbeitsklima im Labor der Kinderklinik Jena.

Besonderer Dank gebührt meiner Familie und meinen Freunden, die mich zu jeder Zeit und auf jede erdenkliche Weise unterstützen. Vor allem meiner Mutter möchte ich dafür danken, dass sie mich in ihrer aufopferungsvollen Weise als einen geliebten Menschen zu Dankbarkeit und Zielstrebigkeit erzogen hat.

Ihr Beispiel motiviert mich, stets mein Bestes zu geben.

Zuletzt möchte ich von ganzem Herzen meiner Freundin und Verlobten Katrin Hildebrand danken, die mich sowohl in der Zeit im Labor als auch während des Schreibens und darüber hinaus auf ihre liebevolle Art unterstützt und mir die Kraft gegeben hat, durchzuhalten und weiterzumachen.

Danke, dass ich dich an meiner Seite wissen darf!

9.4. Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,
ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,
mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: Prof. Dr. med. James F. Beck, Dr. Jürgen Sonnemann, Dr. Christian Marx, Sabine Becker,
die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,
dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und
dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Jena, den

Marc Schaarschmidt